通阳健腰方通过激活TGF-β1/Smad2/3信号通路抑制髓核细胞凋亡并延缓大鼠椎间盘退变

王 毅[1,2,3],张国腾[1,2,3],周 沛[1,2],周剑鹏[1,2,3]
[1]广州中医药大学附属广州中医医院骨科,广东 广州 510130;[2]广州医科大学附属中医医院骨科,广东 广州 510130;[3]广州医科大学中西医结合研究所,广东 广州 510180

摘要:目的 探讨通阳健腰方对椎间盘退变(IDD)的保护作用及其可能机制,重点观察其对大鼠髓核细胞凋亡及TGF-β1/Smad2/3信号通路的影响,并结合MRI评价其体内干预效果。**方法** 体外实验中,分离并培养大鼠髓核细胞,采用不同浓度通阳健腰方干预24、48 h,通过CCK-8法筛选适宜干预浓度和时间。在此基础上,将细胞分为Control组、Model组(10 ng/mL IL-1β)、TYJY组(IL-1β+通阳健腰方)、TYJY+SB-431542组(IL-1β+通阳健腰方+10 μmol/L SB-431542)和SB-431542组(IL-1β+10 μmol/L SB-431542),采用Western blotting和qPCR检测各组TGF-β1、Smad2/3、Bcl-2、Bax及caspase-3的蛋白和mRNA表达。体内实验中,将30只SD大鼠随机分为对照组、模型组、通阳健腰方低剂量组(5.4 g·kg^{-1})、通阳健腰方高剂量组(21.6 g·kg^{-1})及塞来昔布组(0.02 g·kg^{-1}),6只/组,采用针刺法建立IDD模型,连续灌胃30 d后行尾椎MRI T2WI扫描,依据Pfirrmann分级评估椎间盘退变程度,并采用HE染色观察椎间盘及肝、肾组织病理学变化。**结果** CCK-8结果显示,0.1 mg/mL通阳健腰方干预24 h时髓核细胞活性最佳(P<0.05)。与Control组比较,Model组髓核细胞中TGF-β1、Smad2/3及Bcl-2蛋白和mRNA表达降低,Bax和caspase-3表达升高(P<0.05);与Model组比较,TYJY组TGF-β1、Smad2/3及Bcl-2表达升高,Bax和caspase-3表达降低(P<0.05);加入SB-431542后,上述改善作用被部分逆转。体内实验显示,与模型组比较,通阳健腰方低、高剂量组及塞来昔布组椎间盘Pfirrmann分级和组织学评分均降低(P<0.01),其中通阳健腰方高剂量组改善更明显。HE染色显示,各组大鼠肝、肾组织未见明显病理学损伤。**结论** 通阳健腰方可减轻IL-1β诱导的髓核细胞凋亡,并改善IDD大鼠的影像学和组织学退变表现,其作用机制可能与激活TGF-β1/Smad2/3信号通路有关。

关键词:通阳健腰方;椎间盘退变;炎症反应;细胞凋亡;髓核细胞

Tongyang Jianyao Formula inhibits nucleus pulposus cell apoptosis and delays intervertebral disc degeneration in rats by activating the TGF-β1/Smad2/3 signaling pathway

WANG Yi[1,2,3], ZHANG Guoteng[1,2,3], ZHOU Pei[1,2], ZHOU Jianpeng[1,2,3]
[1]Department of Orthopedics, The Affiliated Guangzhou Hospital of TCM of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510130, China; [2]Department of Orthopedics, The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510130, China; [3]Institute of Integration of Traditional and Western Medicine of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510180, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of Tongyang Jianyao Formula on intervertebral disc degeneration (IDD) and its potential mechanisms, with particular emphasis on its effects on apoptosis of rat nucleus pulposus cells and the TGF-β1/Smad2/3 signaling pathway, as well as its in vivo therapeutic efficacy assessed by magnetic resonance imaging (MRI). **Methods** In the in vitro experiments, rat nucleus pulposus cells were isolated and cultured, and treated with different concentrations of Tongyang Jianyao Formula for 24 and 48 h. Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was used to determine the optimal intervention concentration and duration. Based on these results, the cells were assigned to five groups: control group, model group (10 ng/mL IL-1β), TYJY group (IL-1β+Tongyang Jianyao Formula), TYJY+SB-431542 group (IL-1β+Tongyang Jianyao Formula+10 μmol/L SB-431542), and SB-431542 group (IL-1β+10 μmol/L SB-431542). Protein and mRNA expression levels of TGF-β1, Smad2/3, Bcl-2, Bax, and caspase-3 were measured by Western blotting and quantitative real-time PCR (qPCR), respectively. In the in vivo experiments, thirty Sprague-Dawley rats were randomly divided into five groups: Control group, model group, low-dose Tongyang Jianyao Formula group (5.4 g·kg^{-1}), high-dose Tongyang Jianyao Formula group (21.6 g·kg^{-1}), and celecoxib group (0.02 g·kg^{-1}), with six rats in each group. An IDD Model was established by needle puncture. After 30 days of continuous intragastric administration, MRI T2-weighted imaging (T2WI) of the caudal intervertebral discs was performed. The degree of disc degeneration was evaluated using the Pfirrmann grading system, and histopathological changes in the intervertebral disc, liver, and kidney tissues were examined by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Result** CCK-8 assay showed that treatment with 0.1 mg/mL Tongyang Jianyao Formula for 24 h resulted in the highest viability of nucleus pulposus cells (P<0.05). Compared with the control group, the model group showed significantly decreased protein and mRNA expression of TGF-β1, Smad2/3, and Bcl-2, together with significantly increased expression of Bax and caspase-3 (P<0.05). Compared with the model group, the TYJY group exhibited significantly increased expression of TGF-β1, Smad2/3, and Bcl-2, and significantly decreased expression of Bax and caspase-3 (P<0.05). These beneficial effects were partially reversed by the addition of SB-431542. In vivo, compared with the model group, the low- and high-dose Tongyang Jianyao Formula groups and the

收稿日期:2026-01-31
基金项目:广东省医学科研基金项目(A2023282);广州市科技计划项目(2024A03J0788)
作者简介:王 毅,医师,E-mail: dwangyi0911@163.com
通信作者:周剑鹏,主任医师,E-mail: zjp800709@163.com

celecoxib group showed significantly reduced Pfirrmann grades and histological scores of intervertebral discs (P<0.01), with a more pronounced improvement observed in the high-dose group. HE staining revealed no obvious pathological damage in the liver or kidney tissues of rats in any group. **Conclusion** Tongyang Jianyao Formula attenuates IL-1β-induced apoptosis of nucleus pulposus cells and ameliorates radiological and histopathological degeneration in rats with IDD. Its protective effects may be associated with activation of the TGF-β1/Smad2/3 signaling pathway.

Keywords: Tongyang Jianyao Formula; intervertebral disc degeneration; inflammatory response; apoptosis; nucleus pulposus cells

椎间盘退变(IDD)是慢性下腰痛的重要病理基础之一,具有高患病率、高复发率及致残风险,已成为全球性公共卫生问题[1]。流行病学及基础研究表明,IDD并非单纯年龄相关性改变,而是机械负荷异常、炎症反应、细胞外基质降解及细胞死亡共同作用的结果[2]。其中,髓核细胞作为维持椎间盘结构与功能稳态的核心细胞群,其数量减少和功能障碍被认为是驱动退变进展的关键环节[3]。因此,围绕保护髓核细胞、延缓椎间盘结构破坏的干预策略,已成为IDD研究的重要方向。

既往研究显示,炎症微环境在IDD发生发展中具有重要作用[4, 5]。白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)等促炎因子可诱导髓核细胞凋亡、抑制基质合成并促进分解代谢,从而加重IDD[6]。在线粒体凋亡通路中,Bcl-2、Bax及caspase-3等分子参与调控髓核细胞生存状态[7]。与此同时,TGF-β/Smad信号通路在维持椎间盘组织稳态、促进细胞外基质合成及抑制细胞凋亡方面具有重要意义,其中TGF-β1/Smad2/3通路被认为是调控髓核细胞退变表型的重要机制之一[8]。然而,目前关于中药复方是否可通过该通路发挥干预作用,仍缺乏体内外相结合的系统研究。

中医药在腰痛及退行性脊柱疾病防治中具有长期应用基础,补肾壮骨、祛湿通络类方药在改善疼痛症状和延缓组织退变方面显示出一定潜力[9, 10]。通阳健腰方是在临床经验基础上形成的院内经验方,具有温肾助阳、祛湿通络之意,临床用于腰椎退行性疾病治疗已取得一定疗效,但其防治IDD的实验依据及分子机制尚不明确[11]。基于此,本研究拟从体外髓核细胞损伤模型和体内IDD大鼠模型两个层面,观察通阳健腰方对髓核细胞凋亡、TGF-β1/Smad2/3信号通路及椎间盘影像学、组织学退变的影响,以期为其临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *动物* SPF级8~10周龄雄性SD大鼠30只,体质量250~300 g,购自南方医科大学实验动物管理中心,动物生产许可证号:SCXK(粤)2021-0041。大鼠饲养于广州中医药大学第一附属医院动物实验中心。饲养条件为:12 h/12 h明暗交替,温度23±2 ℃,湿度(55±15)%,噪声≤60 dB,自由饮水进食。本研究经广州中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会审批(审批号:GZTCMF1-20250015)。

1.1.2 *细胞* 大鼠椎间盘髓核细胞购于武汉尚恩生物技术有限公司(货号:SNP-R085)。

1.1.3 *试剂* IL-1β试剂(联科生物);CCK-8检测试剂盒(美仑);BCA蛋白定量试剂盒(中晖赫彩);SDS-PAGE凝胶配制试剂盒(普利莱);ECL发光显示液(弗德生物);TGF-β1、Smad2/3、Bcl-2、Bax、caspase-3等抗体(Affiaity);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗(碧云天);HiScript Ⅲ RT SuperMix for qPCR、ChamQ Universal SYBP qPCR Master(诺维赞)。

1.1.4 *主要仪器* 二氧化碳培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);酶标仪(BioTek);梯度PCR仪(北京六一生物科技有限公司);实时荧光定量PCR仪(Jena);harmaScan 70/16 US小动物磁共振成像系统(7.0T)(Bruker)。

1.1.5 *药物* 通阳健腰方组方如下:盐巴戟天10 g、盐杜仲10 g、淫羊藿10 g、薏苡仁30 g、路路通10 g、桑枝15 g、大腹皮10 g、两面针10 g、炙甘草15 g,购于广州中医药大学附属中医医院药房。按照配伍比例称取药材,加入适量蒸馏水浸泡30 min,先用武火煎煮30 min后,更改为文火煎煮45 min,使用多层纱布过滤药液。往中药滤渣中继续加适量纯水,加热煎煮30 min,分离并过滤药液。将2次煎煮的药液混合均匀后再次进行高温浓缩至21.6 g/mL,于4 ℃冰箱中保存。阳性药物塞来昔布胶囊,规格0.2 g/粒,购于广州中医药大学附属中医医院药房,用蒸馏水配制成0.2 g/mL的灌胃液。各组大鼠按体质量计算灌胃体积,剂量为10 mL/kg。

1.2 方法

1.2.1 *通阳健腰方冻干粉及其溶液的制备* 浓缩药液铺于培养皿表面,依次放于-20 ℃冰箱冻存凝固,然后置于-80 ℃冰箱过夜。次日取出,放入冻干机中冻干。冻干完毕后,用容器将冻干粉收集,置于-20 ℃冰箱中保存备用。

使用电子天平准确称取一定重量冻干粉,放入10 mL离心管中,加入完全培养基使其溶解,使用旋涡混合器将其充分混匀。在超净工作台上用10 mL注射器吸取混匀的通阳健腰方溶液,用0.22 μm的微孔滤膜进行过滤,收集至新的无菌离心管中,分装并做好标志后,放入-20 ℃冰箱中保存或用于后续实验。

1.2.2 髓核细胞培养、分组与给药 本实验所用大鼠椎间盘髓核细胞购于武汉尚恩生物技术有限公司，使用含10%胎牛血清、1%链-青霉素的DMEM/F-12培养液在37℃、5% CO_2温育箱中进行培养，培养第3代髓核细胞用于后续实验。

选取生长状态良好的大鼠髓核细胞，按5×10^5/孔接种至6孔板中。随机分为以下5组：Control组：正常细胞培养，不做任何处理；Model组：只做IL-1β（10 ng/mL）刺激；TYJY组：IL-1β（10 ng/mL）刺激加用通阳健腰药方提取液；TYJY+SB-431542组：IL-1β（10 ng/mL）刺激加用通阳健腰药方提取液以及TGF-β1抑制剂（10 μmol/L）；SB-431542组：IL-1β（10 ng/mL）刺激加入TGF-β1抑制剂（10 μmol/L）。各组培养至规定时间后，将上述各组细胞进行后续相关指标检测。

1.2.3 CCK-8检测通阳健腰方给药浓度 取第3代生长状态良好的大鼠髓核细胞，以5000/孔接种于2个96孔板中，分别标记24、48 h。常规培养过夜至细胞贴壁。在96孔板分别加入不同浓度的通阳健腰方溶液（0、0.05、0.1、0.25、0.5、0.75、1、2 mg/mL），在培养箱中分别培养24、48 h。到检测时间点，加入10 μL/孔 CCK-8试剂，置于37 ℃培养箱中孵育2 h，用酶标仪检测$A_{450\,nm}$。

1.2.4 Western blotting 收集各组处理后髓核细胞，使用含有PMSF的RIPA裂解液提取各组细胞总蛋白，BCA法定量样品蛋白浓度后，上样电泳，冰浴转膜。洗涤PVDF膜，5%脱脂奶粉室温封闭2 h后，将PVDF膜与一抗TGF-β1（1∶1000）、Smad2/3（1∶1000）、Bax（1∶1000）、Bcl-2（1∶1000）、caspase-3（1∶1000）和内参GAPDH，于4 ℃孵育过夜。在TBST中洗涤3次，10 min/次，加入山羊抗兔IgG二抗（1∶5000），于室温孵育2 h。膜上滴入ECL发光显色液，上机曝光。使用Image J软件对蛋白条带进行灰度扫描，分析蛋白相对表达量。

1.2.5 qPCR检测 收集各组处理后髓核细胞，使用RNA-easy Isolation Reagent提取各组细胞总RNA，使用核酸浓度测定仪检测总RNA纯度及浓度。按照反转录试剂盒操作说明将RNA反转录为cDNA，qPCR反应体系的配制以及反应参数参考ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix试剂盒说明书进行。基因引物由北京六合华大基因科技有限公司合成，引物序列（表1）。使用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算mRNA相对表达水平。

1.2.6 动物造模、分组及给药 选取健康SD大鼠30只，适应性饲养1周后，随机分为对照组、模型组、通阳健腰方低剂量组、通阳健腰方高剂量组和塞来昔布组，6只/组。除对照组外，其余各组均参照既往方法采用针刺法构建IDD大鼠模型[11]。腹腔注射戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉大鼠。通过触摸尾椎定位实验水平（Co6/7）。消毒后使用22 G无菌针在两终板间平行刺入纤维环，进入髓核，插入深度约5 mm，并将针头旋转360°后负压抽吸，保持30 s，然后将针从椎间盘中心穿透，直至尾部对侧的皮肤破裂，拔针，棉球压迫止血。建模成功后的次日开始灌胃。通阳健腰方高剂量组予21.6 g/kg通阳健腰方灌胃，通阳健腰方低剂量组予5.4 g/kg通阳健腰方灌胃，塞来昔布组予0.02 g/kg塞来昔布灌胃，模型组及对照组给予10 mL/kg蒸馏水灌胃，2次/d，连续30 d。

表1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Primer name	Primer sequence
TGF-β1	F: GCTGAACCAAGGAGACGGAATA
	R: GCAGGTGTTGAGCCCTTTCC
Smad2	F: ACTGCCGCCTCTGGATGACTAT
	R: AGAGAGTGGTAGGAGACAGTTCAGC
Smad3	F: CGAGAACACTAACTTCCCCGCT
	R: GTGGTTCATCTGGTGGTCGCTA
Bax	F: GGCGAATTGGCGATGAACTG
	R: CCCAGTTGAAGTTGCCGTCT
Bcl-2	F: GGGGCTACGAGTGGGATACT
	R: GACGGTAGCGACGAGAGAAG
caspase-3	F: AGTGGAGGCCGACTTCCTGTA
	R: TGGCGCAAAGTGACTGGAT
GAPDH	F: CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
	R: GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT

F: Forward primer; R: Reverse primer.

1.2.7 MRI观察大鼠鼠尾椎间盘退变情况 本实验于南方医科大学中心实验室采用Bruker PharmaScan 70/16 US小动物磁共振成像系统（7.0T）进行扫描。大鼠经3%~4%异氟烷诱导麻醉后，俯卧位固定于扫描床，以1.5%~2%异氟烷维持麻醉。将鼠尾沿磁体长轴方向平直固定，选择适配线圈紧贴目标区域放置。连接呼吸监测探头并开启加热系统维持体温于36~37 °C。启动ParaVision软件，将动物送入磁体中心，行三平面定位扫描确认鼠尾位于视野中心。T2加权成像采用RARE序列，参数设置：TR 2500~3000 ms，TE 33~40 ms，RARE因子8，FOV 25 mm×25 mm，矩阵256×256，层厚0.5~1.0 mm，平均次数2~4次。根据研究需要采集轴位、矢状位及冠状位图像。扫描过程中持续监测动物生理状态，采集完成后关闭麻醉，待大鼠完全苏醒后送回饲养笼。收集扫描所得图像，由2位研究人员采用盲法按照Pfirrmann法对椎间盘的退变程度评级。

1.2.8 苏木素-伊红（HE）染色评估椎间盘组织形态变化及安全性分析 MRI扫描完成后，采用过量异氟烷麻醉联合颈椎脱臼法处死大鼠。于鼠尾根部离断完整鼠尾，开腹取肝左叶组织块（约0.5 cm×0.5 cm×0.3 cm）及沿长轴纵切的单侧肾脏，生理盐水冲洗后立即置于10%中性缓冲福尔马林中固定24~48 h。鼠尾标本固定后转入

10%~14% EDTA脱钙液中脱钙2~4周，2~3 d/次更换脱钙液，至针刺无阻力时终止脱钙，流水冲洗4~6 h。所有组织经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后，于56~60 ℃石蜡中浸蜡包埋。使用石蜡切片机制备4~5 μm厚度连续切片，40 ℃展片后60 ℃烘烤1~2 h。切片经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水后，苏木精染色5~10 min，1%盐酸乙醇分化，自来水返蓝；继以0.5%伊红染色1~3 min，梯度乙醇脱水、二甲苯透明后中性树胶封片。光学显微镜下观察鼠尾椎间盘结构及肝、肾组织形态学变化，采集图像进行分析。2位研究人员采用盲法对IDD程度进行独立评估，并取其平均值用于后续分析。

1.2.9 统计学分析　采用SPSS 25.0统计软件进行数据分析。符合正态分布的计量数据以均数±标准差表示，组间比较采用单因素方差分析，两两比较则采用LSD检验。以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 通阳健腰方对髓核细胞增殖的影响

在中药干预下，通阳健腰方溶液大体可以增强髓核细胞活性，其中浓度为0.1 mg/mL通阳健腰方溶液处理后的髓核细胞活力增强效果明显。随着时间推移，各组处理下的细胞增殖活力不断提高。在培养48 h后，与其他各组相比，浓度为0.1 mg/mL通阳健腰方溶液处理时髓核细胞活性最明显（P<0.05）。当中药浓度继续增加时，髓核细胞活力可能有下降趋势，甚至有可能抑制细胞生长活力。因此本实验选浓度为0.1 mg/mL通阳健腰方溶液进行干预髓核细胞48 h（图1）。

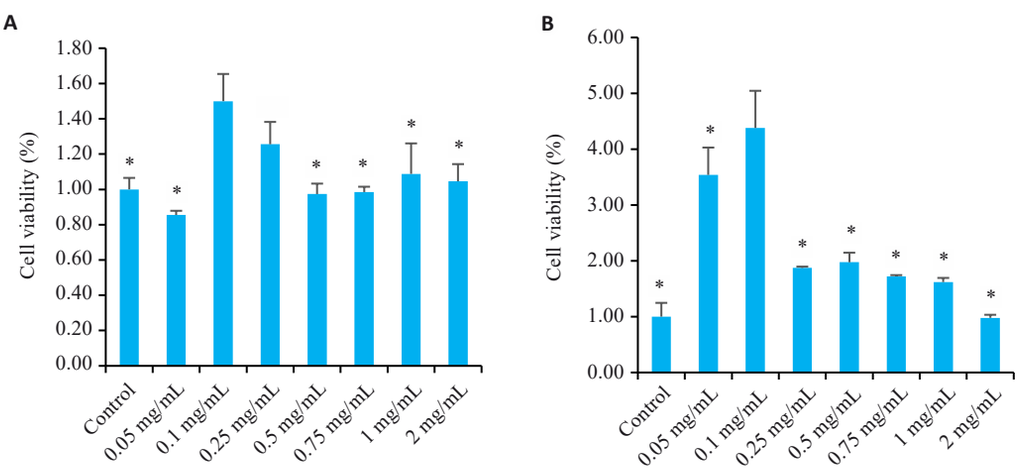

图1 不同浓度通阳健腰方对髓核细胞的影响与各实验组相比

Fig.1 Effects of Tongyang Jianyao Formula at different concentrations on nucleus pulposus cells. **A:** Intervention with the Tongyang Jianyao Formula at 24 h; **B:** Intervention with the Tongyang Jianyao Formula at 48 h. *P<0.05 *vs* 0.1 mg/mL, n=3.

2.2 通阳健腰方可能抑制IL-1β诱导下髓核细胞的损伤

Western blotting结果显示，与Control组相比，Model组的Bcl-2蛋白表达量降低，Bax和caspase-3蛋白表达量升高，差异有统计学意义（P<0.05）。与Model组相比，TYJY组Bcl-2蛋白表达量升高，Bax和caspase-3蛋白表达量降低，差异有统计学意义（P<0.05，图2）。

qPCR检测结果发现，与Control组相比，Model组的Bcl-2 mRNA表达量降低，Bax和caspase-3 mRNA表达量升高，差异有统计学意义（P<0.05）。与Model组相比，TYJY组Bcl-2 mRNA表达量升高，Bax和caspase-3 mRNA表达量降低，差异有统计学意义（P<0.05，图3）。

2.3 通阳健腰方可能调控TGF-β1/Smad2/3信号通路影响髓核细胞损伤

Western blotting结果显示，Model组的TGF-β1、Smad2/3蛋白表达量低于与Control组和TYJY组，高于SB-43154组，差异有统计学意义（P<0.05）。与TYJY组相比，TYJY+ SB-431542组的TGF-β1、Smad2/3蛋白表达量降低，差异有统计学意义（P<0.05，图4）。

RT-PCR检测结果发现，Model组的TGF-β1、Smad2及Smad3 mRNA表达量低于与Control组和TYJY组，高于SB-43154组，组间差异有统计学意义（P<0.05）。与TYJY组相比，TYJY+SB-431542组的TGF-β1、Smad2及Smad3 mRNA表达量降低，差异有统计学意义（P<0.05，图5）。

2.4 通阳健腰方对大鼠椎间盘影像学分级及组织学评分的影响

在MRI检查T2加权图像中，发现对照组的椎间盘结构完整，髓核部分呈现均匀的高信号，髓核与纤维环分界清晰，椎间隙高度正常。模型组的椎间盘结构变形，髓核信号显著降低，呈现不均匀低信号，髓核与纤维环的分界模糊，且伴有椎间隙明显变窄。塞来昔布组及通阳健腰方各剂量组椎间盘髓核区域仍可见部分高信

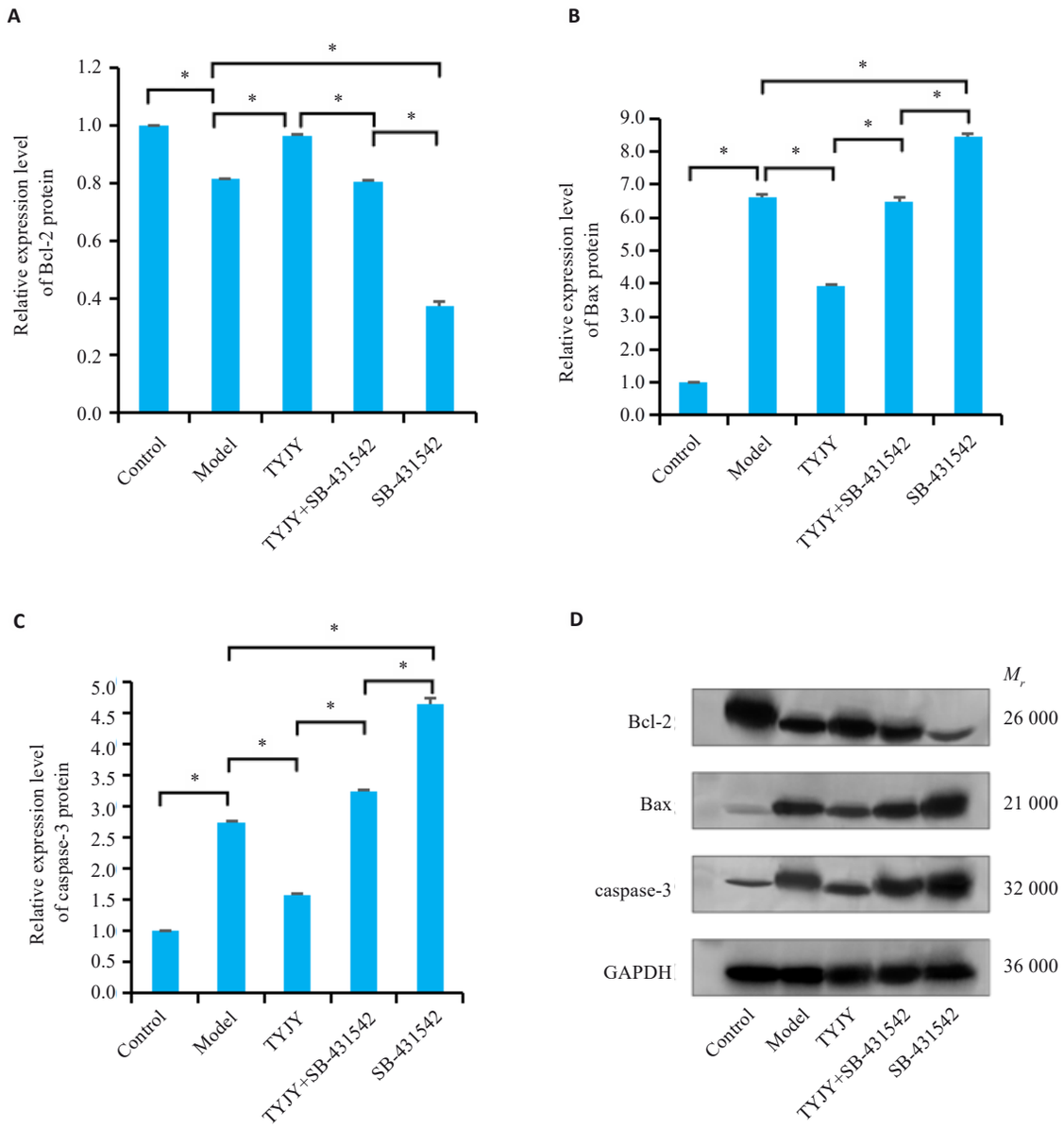

图2 各组干预后髓核细胞Bcl-2、Bax和caspase-3蛋白相对表达水平及蛋白条带

Fig. 2 Relative protein expression levels and bands of Bcl-2, Bax and caspase-3 in nucleus pulposus cells after intervention in each group. **A:** Relative expression level of Bcl-2 protein. **B:** Relative expression level of Bax protein. **C:** Relative expression level of caspase-3 protein. **D:** Protein bands of BCL-2, Bax and caspase-3. *P<0.05, n=3.

号残留,其椎间盘整体形态、髓核与纤维环分界清晰度及椎间隙高度均较模型组有所改善。与对照组相比,模型组的Pfirrmann分级增加(P<0.001);与模型组相比,通阳健腰方低剂量组、高剂量组和塞来昔布组的Pfirrmann分级均降低(P<0.01)。HE染色结果显示,对照组椎间盘结构完整,髓核形态饱满,呈圆形或椭圆形,纤维环层状排列规整、无断裂,髓核与纤维环分界清晰。模型组椎间盘高度明显降低,髓核组织大量丢失,纤维环排列紊乱、部分断裂,髓核与纤维环界限消失,组织学评分较对照组升高(P<0.001)。与模型组相比,塞来昔布组及通阳健腰方低剂量组、高剂量组的上述病理改变均有不同程度的改善,组织学评分降低(P<0.01)。此外,各组大鼠肝、肾组织HE染色结果显示,肝小叶结构正常,肝细胞排列整齐;肾小球及肾小管结构完整,均未见明显炎症细胞浸润、坏死等病理改变(图6、表2)。

3 讨论

IDD的核心病理改变包括髓核细胞数量减少、细胞外基质稳态失衡及终末结构破坏,其中髓核细胞凋亡增加被认为是推动退变进展的重要环节[12]。既往研究提示,IL-1β可通过增强炎症反应和分解代谢,诱导髓核细胞表型失稳并促进凋亡,从而加速IDD进展[1, 3]。本研究

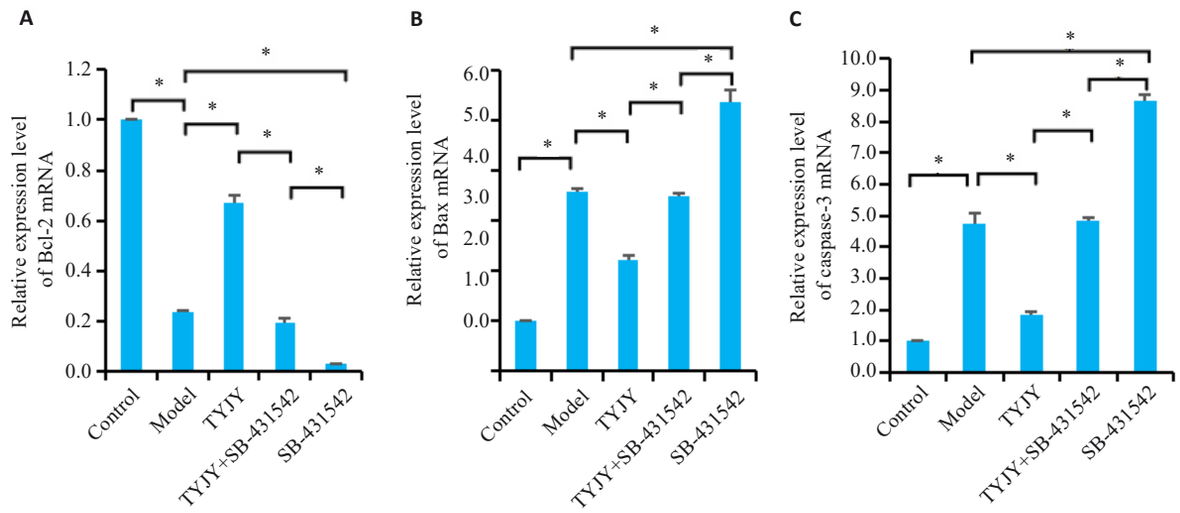

图3　各组干预后髓核细胞Bcl-2、Bax和caspase-3 mRNA相对表达水平

Fig.3　Relative mRNA expression levels of Bcl-2, Bax, and caspase-3 in nucleus pulposus cells in each group. **A:** Relative expression level of Bcl-2 mRNA. **B:** Relative expression level of Bax mRNA. **C:** Relative expression level of caspase-3 mRNA. *P<0.05, n=3.

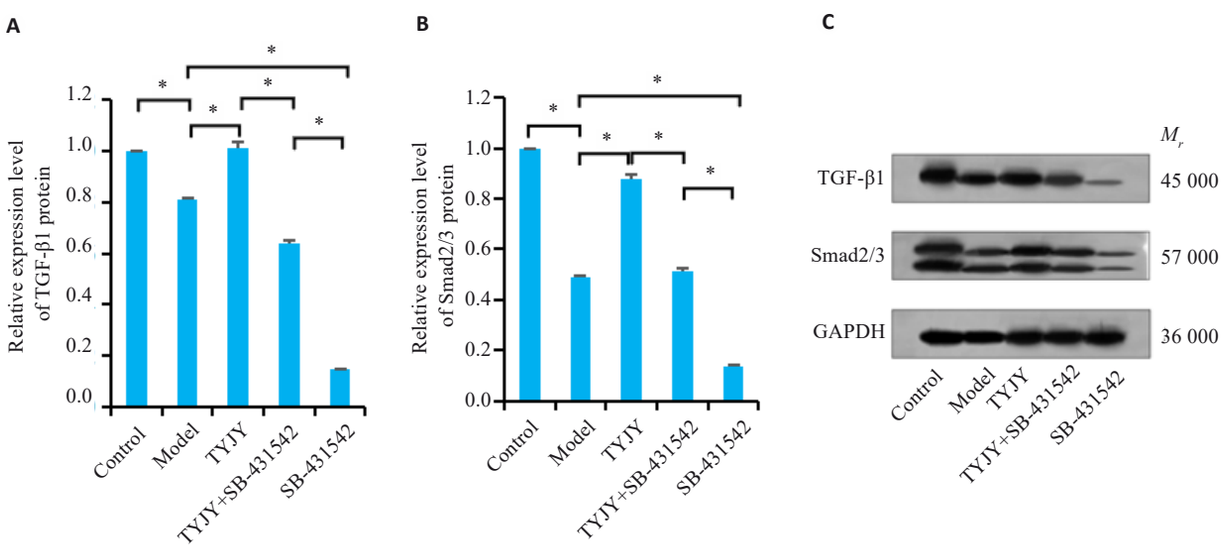

图4　各组干预后髓核细胞TGF-β1和Smad2/3蛋白相对表达水平及蛋白条带

Fig.4　Relative protein expression levels and bands of TGF-β1 and Smad2/3 in nucleus pulposus cells after intervention in each group. **A:** Relative expression level of TGF-β1 protein. **B:** Relative expression level of Smad2/3 protein. **C:** Protein bands of TGF-β1 and Smad2/3. *P<0.05, n=3.

采用IL-1β构建髓核细胞损伤模型后，观察到TGF-β1、Smad2/3及Bcl-2表达下调，而Bax、caspase-3表达上调，提示炎症刺激已诱导明确的促凋亡状态。这一结果与既往文献关于促炎因子参与IDD的结论基本一致[13, 14]。在此基础上，通阳健腰方干预可部分逆转上述变化，表明其对炎症环境下髓核细胞损伤具有保护作用，而非仅表现为一般性细胞活性改善。

细胞凋亡的发生与线粒体通路密切相关，其中Bcl-2家族和caspase家族构成调控网络的关键节点[15, 16]。Bcl-2主要发挥抗凋亡作用，而Bax可促进线粒体膜通透性增加并触发下游caspase级联反应，caspase-3则是凋亡执行阶段的重要效应分子[17-19]。既往研究表明，IL-1β刺激可导致髓核细胞中Bax及caspase-3升高，Bcl-2降低，并伴随细胞活性下降和基质代谢异常[20, 21]。本研究所得结果与此一致，提示所建立的体外模型具备较好的退变相关生物学特征。进一步分析显示，通阳健腰方可上调Bcl-2并下调Bax、caspase-3表达，说明其干预作用可能与调节线粒体凋亡通路有关。与既往主要关注单一凋亡指标变化的研究相比，本研究同时在蛋白和mRNA层面观察到一致趋势，从而提高了结果解释的稳定性。

TGF-β/Smad信号通路在维持椎间盘组织稳态中具有重要调节作用。适度的TGF-β1信号有助于维持髓核细胞活性、促进基质合成并抑制退变相关变化，而其失

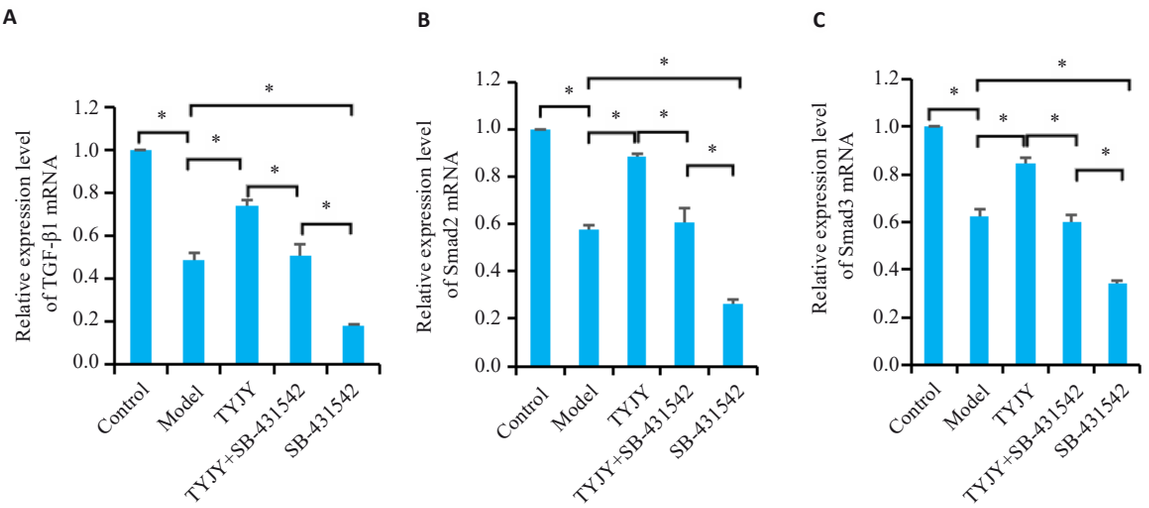

图5 各组干预后髓核细胞TGF-β1、Smad2、Smad3 mRNA相对表达水平

Fig.5 Relative protein expression levels of TGF-β1, Smad2, and Smad3 in nucleus pulposus cells in each group. **A:** Relative expression level of TGF-β1 mRNA. **B:** Relative expression level of Smad2 mRNA. **C:** Relative expression level of Smad3 mRNA. *P<0.05, n=3.

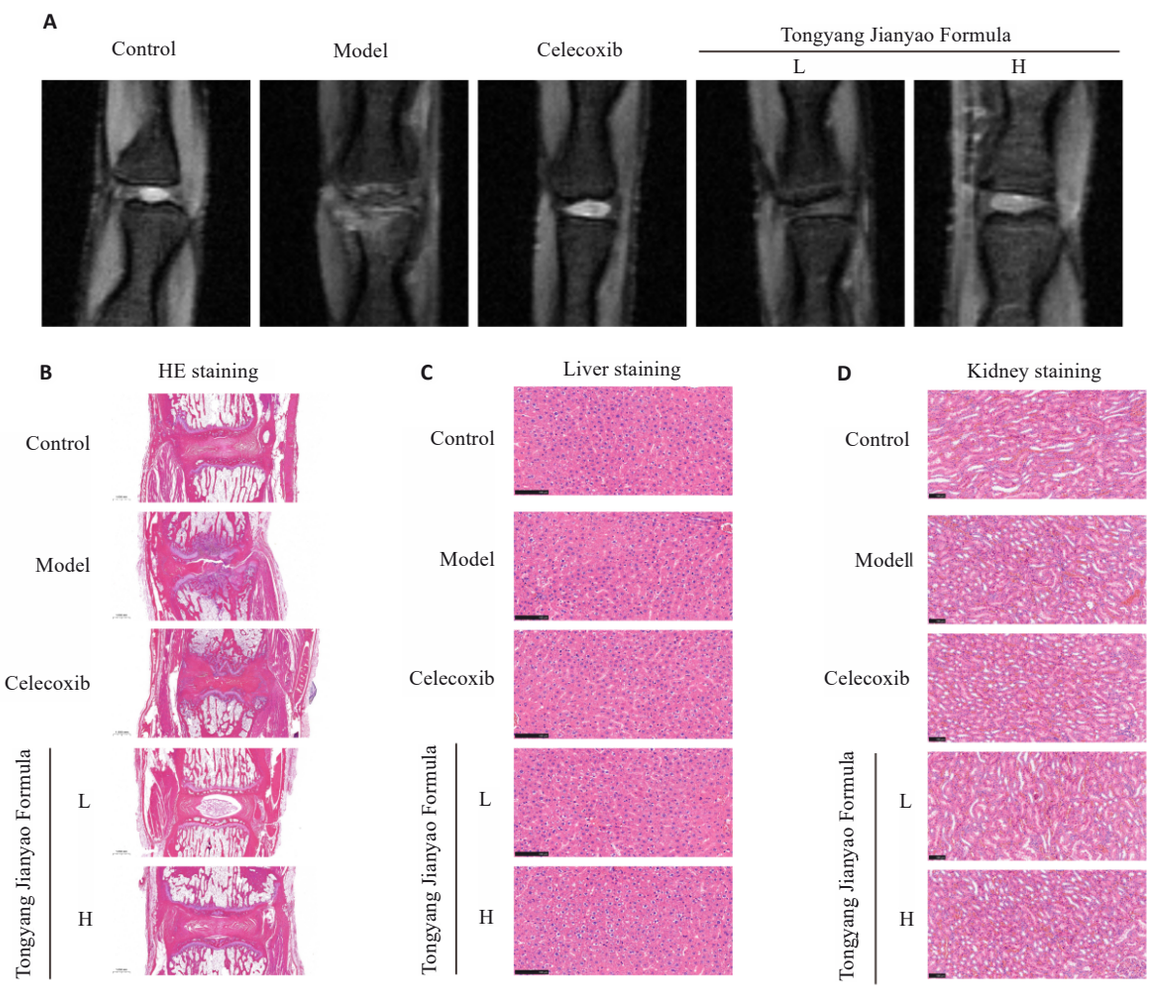

图6 通阳健腰方对大鼠椎间盘影像学及组织学影响

Fig.6 Effects of Tongyang Jianyao Formula on imaging and histology of the intervertebral disc in rats. **A:** MRI T2-weighted images of the caudal intervertebral discs in each group of rats. **B:** HE staining of caudal intervertebral discs in rats of each group, scale bar: 1.0 mm. **C:** HE staining of liver in rats of each group, scale bar: 100 μm. **D:** HE staining of kidney in rats of each group, scale bar: 100 μm. L: Low dose; H: High dose.

表2 通阳健腰方对大鼠椎间盘影像学分级及组织学评分的影响

Tab.2 Effects of Tongyang Jianyao Formula on radiographic grading and histological scoring of rat intervertebral discs (*Mean*±*SD*, *n*=6)

Group	Dose (g/kg)	Pfirrmann grade	Histological score
Control	-	1.00±0.00	2.06±0.18
Model	-	4.56±0.28***	14.55±0.72***
Celecoxib	0.02	1.50±0.23$^{\#\#\#}$	4.44±0.68$^{\#\#\#}$
Tongyang Jianyao Formula (low dose)	5.40	2.73±0.14$^{\#\#}$	9.41±0.77$^{\#\#}$
Tongyang Jianyao Formula (high dose)	21.60	1.95±0.45$^{\#\#\#}$	5.24±0.75$^{\#\#\#}$

***P<0.001 *vs* Control; $^{\#\#}P$<0.01; $^{\#\#\#}P$<0.001 *vs* Model.

衡则可能参与IDD的发生发展[22-24]。本研究发现，IL-1β刺激后TGF-β1及Smad2/3表达下降，提示炎症条件下该保护性通路受到抑制；通阳健腰方干预后，上述分子表达明显回升，并伴随凋亡相关指标改善，提示其抗凋亡作用可能与TGF-β1/Smad2/3通路激活相关。在加入TGF-βⅠ型受体抑制剂SB-431542后，通阳健腰方对上述指标的调节作用被部分削弱，说明该通路在其发挥作用过程中具有一定介导意义。

除体外机制实验外，本研究还通过针刺法建立IDD大鼠模型，并采用MRI与组织病理学进行综合评价。MRI T2WI信号变化能够较好反映椎间盘含水量及基质完整性，Pfirrmann分级则被广泛用于退变程度判定，且与组织学改变具有较好一致性[25-27]。本研究中，模型组表现为T2WI信号减低和Pfirrmann分级升高，提示模型建立成功；通阳健腰方干预后，影像学退变程度减轻，组织学上髓核形态及纤维环排列亦有所改善。该结果说明通阳健腰方的保护作用并不局限于细胞水平，而能够在整体动物模型中体现为结构性获益。与部分仅依赖组织学或分子指标判断疗效的研究不同，本研究将影像学评价纳入证据链，有助于提高结果的完整性和临床相关性。

中医药在椎间盘退行性疾病中的应用逐渐受到重视，既往研究显示，补肾活血、祛湿通络类方药可通过调节炎症反应、氧化应激、细胞凋亡及基质代谢等多途径延缓IDD进展[9, 28-30]。本研究所观察到的通阳健腰方抗凋亡及改善影像学、组织学退变的结果，与上述研究方向基本一致，但进一步结合TGF-β1/Smad2/3通路和抑制剂验证，对其机制进行了较为具体的界定。需要指出的是，本研究尚未检测Smad2/3磷酸化水平，也未纳入Aggrecan、Collagen II、MMPs等基质代谢指标，因此通阳健腰方对IDD的调控网络仍有待深入阐明。此外，本研究样本量和干预周期有限，后续仍需通过更长期、更多维度的实验加以验证。

综上，通阳健腰方可减轻IL-1β诱导的髓核细胞凋亡，并改善IDD大鼠的影像学和组织学退变表现，其作用机制可能与激活TGF-β1/Smad2/3信号通路有关。

参考文献：

[1] Hartvigsen J, Hancock MJ, Kongsted A, et al. What low back pain is and why we need to pay attention[J]. Lancet, 2018, 391(10137): 2356-67.

[2] Lund T, Aavikko A, Ristolainen L, et al. Two trajectories of lumbar disc degeneration from adolescence to adulthood: a 23-year longitudinal MRI study[J]. Eur Spine J, 2025. doi: 10.1007/s00586-025-09641-y.

[3] Dowdell J, Erwin M, Choma T, et al. Intervertebral disk degeneration and repair[J]. Neurosurgery, 2017, 80(3S): S46-54.

[4] Risbud MV, Shapiro IM. Role of cytokines in intervertebral disc degeneration: pain and disc content[J]. Nat Rev Rheumatol, 2014, 10(1): 44-56.

[5] Burt KG, Kim MKM, Viola DC, et al. Nuclear factor kappa B over-activation in the intervertebral disc leads to macrophage recruitment and severe disc degeneration[J]. bioRxiv, 2023. doi: 10.1101/2023.08.07.552274.

[6] Li SL, Fang X, Hu SY, et al. On-demand collaborative delivery for remodeling the senescent microenvironment in intervertebral disc degeneration[J]. ACS Nano, 2025, 19(44): 38408-27.

[7] Luo Y, He YZ, Wang YF, et al. LncRNA HCG18 promotes inflammation and apoptosis in intervertebral disc degeneration *via* the miR-495-3p/FSTL1 axis[J]. Mol Cell Biochem, 2024, 479(1): 171-81.

[8] Liu EX, Sun Y, Yang L, et al. Investigating the regulation of the miR-199a-3p/TGF- β/Smad signaling pathway by BSHXF drug-containing serum combined with ADSCs for delaying intervertebral disc degeneration[J]. Front Pharmacol, 2025, 16: 1583635.

[9] Li W, Gong YN, Liu JY, et al. Peripheral and central pathological mechanisms of chronic low back pain: a narrative review[J]. J Pain Res, 2021, 14: 1483-94.

[10] Dai F, Yu PF, Yu ZH, et al. Yiqi Huoxue recipe delayed intervertebral disc degeneration by activating autophagy[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 705747.

[11] 杜 鹏, 柴芳芳, 李玉冰, 等. 通阳健腰方治疗腰椎小关节骨关节炎[J]. 吉林中医药, 2024, 44(12): 1443-7.

[12] Yurube T, Takeoka Y, Kanda Y, et al. Intervertebral disc cell fate during aging and degeneration: apoptosis, senescence, and autophagy[J]. N Am Spine Soc J, 2023, 14: 100210.

[13] Fan N, Yuan S, Hai Y, et al. Identifying the potential role of IL-1β in the molecular mechanisms of disc degeneration using gene expression profiling and bioinformatics analysis[J]. J Orthop Surg

(Hong Kong), 2022, 30: 23094990211068203.

[14] Yan XA, Shen ED, Cui AY, et al. Assessing the causal relationship between CRP, IL-1α, IL-1β, and IL-6 levels and intervertebral disc degeneration: a two-sample Mendelian randomization study[J]. Sci Rep, 2024, 14: 23716.

[15] Kong CG, Park JB. Apoptotic pathway in intervertebral disc degeneration: from molecular pathways to clinical interventions[J]. Diagnostics, 2025, 15(12): 1510.

[16] Wang HQ, Yu XD, Liu ZH, et al. Deregulated miR-155 promotes Fas-mediated apoptosis in human intervertebral disc degeneration by targeting FADD and caspase-3[J]. J Pathol, 2011, 225(2): 232-42.

[17] Wang YJ, Che MX, Xin JG, et al. The role of IL-1β and TNF-α in intervertebral disc degeneration[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 131: 110660.

[18] Zhang CX, Lu ZA, Lyu CL, et al. Andrographolide inhibits static mechanical pressure-induced intervertebral disc degeneration *via* the MAPK/Nrf2/HO-1 pathway[J]. Drug Des Dev Ther, 2023, 17: 535-50.

[19] Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1): 47-59.

[20] Zhang Y, He F, Chen Z, et al. Melatonin modulates IL-1β-induced extracellular matrix remodeling in human nucleus pulposus cells and attenuates rat intervertebral disc degeneration and inflammation[J]. Aging, 2019, 11(22): 10499-512.

[21] Shan L, Xu XM, Zhang J, et al. Increased hemoglobin and heme in MALDI-TOF MS analysis induce ferroptosis and promote degeneration of herniated human nucleus pulposus[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 103.

[22] Chen SL, Lei LC, Li ZM, et al. Grem1 accelerates nucleus pulposus cell apoptosis and intervertebral disc degeneration by inhibiting TGF- β -mediated Smad2/3 phosphorylation[J]. Exp Mol Med, 2022, 54(4): 518-30.

[23] Williams RJ, Tryfonidou MA, Snuggs JW, et al. Cell sources proposed for nucleus pulposus regeneration[J]. JOR Spine, 2021, 4 (4): e1175.

[24] Bian Q, Jain A, Xu X, et al. Excessive activation of TGFβ by spinal instability causes vertebral endplate sclerosis[J]. Sci Rep, 2016, 6: 27093.

[25] Li TH, Qi WH, Mao XN, et al. Prediction of lumbar disc degeneration based on interpretable machine learning models: retrospective cohort study[J]. Spine J, 2025, 25(10): 2335-48.

[26] Tsuchiya K, Okano I, Guven AE, et al. Quantitative assessment of cervical disc degeneration using disc signal intensity index[J]. Spine J, 2025, 25(5): 903-10.

[27] Zehra U, Ilyas MS, Latif R, et al. MRI phenotypes of herniated discs associated with adjacent disc degeneration[J]. J Orthop Res, 2024, 42(5): 1104-10.

[28] Shi FD, Wu ZY, Li ZX, et al. Exploring potential mechanistic aspects of "Biaoben acupoint" acupuncture for lumbar disc herniation using 4D proteomics[J]. Front Neurol, 2025, 16: 1630736.

[29] 马伯骞, 赵继荣, 杨正汉, 等. 中医药治疗椎间盘退变对血清因子影响研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2025, 27(8): 83-8.

[30] 钟浩添, 黎建文, 韩伟超, 等. 中药复方及有效成分治疗椎间盘退变: 多靶点及整体调理理念[J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(24): 6316-27.

（编辑：郎 朗）