

身痛逐瘀汤调控 SIRT1/Nrf2 信号通路改善大鼠 椎间盘退变的作用

黄家俊¹, 吴迪友¹, 陶广义¹, 赵宇¹, 黄俊卿², 杨彬^{2*}

(1. 河南中医药大学骨伤学院, 郑州 450002; 2. 河南省中医院, 郑州 450002)

[摘要] 目的:探讨身痛逐瘀汤对大鼠椎间盘退变(IDD)的影响及其保护作用机制。方法:体外研究:40只雄性大鼠分别灌胃给予生理盐水、身痛逐瘀汤低、中、高剂量(3.38、6.75、13.5 g·kg⁻¹),连续给药7 d后收集血清。另取10只雄性大鼠,分离髓核细胞。以白细胞介素-1 β (IL-1 β)处理来构建IDD细胞模型,分别加入身痛逐瘀汤含药血清和铁死亡抑制剂(Fer-1),探究身痛逐瘀汤含药血清对髓核细胞增殖及铁死亡的影响。为研究沉默信息调节因子1(SIRT1)/核因子E₂相关因子2(Nrf2)在身痛逐瘀汤含药血清调控髓核细胞铁死亡中的作用,在IL-1 β 和身痛逐瘀汤高剂量含药血清处理的同时,分别加入SIRT1抑制剂Ex 527和Nrf2抑制剂ML385干预。细胞增殖与活性检测法(CCK-8)检测细胞活力,EdU染色检测细胞增殖,比色法检测Fe²⁺、谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)水平,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)、长链脂酰辅酶A合成酶4(ACSL4)、II型胶原(Collagen II)、蛋白聚糖(Aggrecan)、SIRT1、Nrf2蛋白表达,免疫荧光检测SIRT1蛋白表达。体内研究:以雄性大鼠为研究对象,采用纤维环穿刺法构建IDD大鼠模型,随机分为假手术组、模型组、身痛逐瘀汤组(13.5 g·kg⁻¹)及阳性药组(尼美舒利分散片,0.18 mg·kg⁻¹),给药体积为1 mL·kg⁻¹。假手术组和模型组则灌胃等体积的生理盐水。给药1次/d,连续28 d。末次给药结束后采用苏木素-伊红(HE)染色法结合Masuda评分法,观察大鼠椎间盘组织病理变化并进行病理学评分。Western blot检测髓核组织中SIRT1、Nrf2、GPX4和Collagen II蛋白表达。结果:与空白组比较,IL-1 β 组髓核细胞中Fe²⁺和MDA含量及ACSL4蛋白水平明显升高(P<0.05),而细胞存活率、GSH浓度和GPX4、Collagen II、Aggrecan蛋白表达均明显降低(P<0.05)。与空白组比较,身痛逐瘀汤含药血清和Fer-1干预逆转了IL-1 β 对髓核细胞活力和铁死亡的影响,髓核细胞中的Collagen II和Aggrecan蛋白水平明显升高(P<0.05)。此外,IL-1 β 组髓核细胞中Sirt1和Nrf2蛋白表达降低(P<0.05)。与IL-1 β 组比较,身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组髓核细胞中SIRT1和Nrf2蛋白表达均明显增加(P<0.05)。与身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组比较,ML385组细胞中Nrf2和GPX4蛋白水平及GSH浓度明显降低,Fe²⁺含量和MDA水平均明显增加(P<0.05)。此外,Ex 527组细胞中的SIRT1、Nrf2和GPX4蛋白水平均降低,较身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组差异有统计学意义(P<0.05)。体内研究结果表明,与假手术组比较,模型组大鼠的椎间盘组织严重退变,病理学评分和ACSL4蛋白水平明显增加(P<0.05),而SIRT1、Nrf2、GPX4和Collagen II蛋白水平则明显降低(P<0.05)。与模型组比较,身痛逐瘀汤组大鼠椎间盘退变得到明显改善,病理学评分和ACSL4蛋白水平明显降低(P<0.05),SIRT1、Nrf2、GPX4和Collagen II蛋白水平明显升高(P<0.05)。结论:身痛逐瘀汤可能激活SIRT1/Nrf2信号通路,抑制IDD大鼠髓核细胞铁死亡,从而延缓IDD进程。

[关键词] 身痛逐瘀汤; 椎间盘退变; 髓核细胞; 铁死亡; 沉默信息调节因子1(SIRT1)/核因子E₂相关因子2(Nrf2)/谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)信号通路

[中图分类号] R285;R289;R259 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2025)03-0029-11

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20241608

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20241106.1638.006>

[网络出版日期] 2024-11-07 17:26:41

Shentong Zhuyutang Regulates SIRT1/Nrf2 Pathway to Ameliorate Intervertebral Disc Degeneration in Rats

HUANG Jiajun¹, WU Diyou¹, TAO Guangyi¹, ZHAO Yu¹, HUANG Junqing², YANG Bin^{2*}

[收稿日期] 2024-08-15

[基金项目] 河南省体育局2023年体育课题研究项目(202320);全国中医临床特色技术传承人才项目(中国中医药人教教育便函[2019]36号);2024年度河南省中医药科学研究专项(2024ZY2066)

[第一作者] 黄家俊,在读硕士,从事中医药防治脊柱和脊柱相关疾病的临床研究,E-mail:huangjiajun0825@163.com

[通信作者] * 杨彬,硕士,副主任中医师,从事中医药防治脊柱和脊柱相关疾病的临床研究,E-mail:byang007@126.com

(1. School of Osteopathy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China;
2. Henan Province Hospital of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of Shentong Zhuyutang in treating intervertebral disc degeneration (IDD) in rats. **Methods:** In the cell experiment, male rats were administrated with normal saline or low-, medium-, and high-dose (3.38, 6.75, 13.5 g·kg⁻¹, respectively) Shentong Zhuyutang by gavage, respectively, and serum samples were collected after 7 days of continuous administration. Another 10 male rats were selected for the isolation of nucleus pulposus cells. The cell model of IDD was established by treatment with interleukin (IL)-1 β . The modeled cells were then treated with Shentong Zhuyutang-containing serum and the ferroptosis inhibitor ferrostatin-1 (Fer-1), respectively, to investigate the effects of Shentong Zhuyutang-containing serum on the proliferation and ferroptosis of nucleus pulposus cells. To study the role of silent information regulator 1 (SIRT1)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) in the regulation of ferroptosis in nucleus pulposus cells by Shentong Zhuyutang-containing serum, this study treated the cells with the SIRT1 inhibitor Ex 527 and the Nrf2 inhibitor ML385, respectively, in addition to the treatment with IL-1 β and high-dose Shentong Zhuyutang-containing serum. The cell-counting kit-8 (CCK-8) assay and EdU staining were employed to measure the cell viability and proliferation, respectively. The Fe²⁺, glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA) levels were measured by colorimetric assay. Western blot was employed to determine the protein levels of glutathione peroxidase 4 (GPX4), acyl-CoA synthetase long-chain family 4 (ACSL4), Collagen II, Aggrecan, SIRT1, and Nrf2. Immunofluorescence was used to detect SIRT1 expression. In the animal experiment, male rats were treated with anulus puncture for the modeling of IDD. Rats were randomly assigned into sham operation, model, Shentong Zhuyutang-containing serum (13.5 g·kg⁻¹), and positive control (nimesulide dispersible tablets, 0.18 mg·kg⁻¹) groups. Rats in the drug intervention groups were administrated with corresponding agents at 1 mL·kg⁻¹, and those in the sham operation and model groups were administrated with equal volumes of normal saline, once daily for 28 consecutive days. At the end of the last administration, the histopathological changes in the intervertebral discs of rats were observed by hematoxylin-eosin staining and scored by the Masuda method. Western blot was employed to determine the protein levels of SIRT1, Nrf2, GPX4, and Collagen II in the nucleus pulposus tissue. **Results:** Compared with the control group, the IL-1 β group of nucleus pulposus cells showed elevated levels of Fe²⁺, MDA, and ACSL4 ($P<0.05$), decreased cell viability, lowered GSH level, and down-regulated protein levels of GPX4, Collagen II, and Aggrecan ($P<0.05$). Shentong Zhuyutang-containing serum and Fer-1 reversed the effects of IL-1 β on the viability and ferroptosis of nucleus pulposus cells and up-regulated the protein levels of Collagen II and Aggrecan in nucleus pulposus cells ($P<0.05$). Compared with the control group, the IL-1 β group showcased down-regulated expression of Sirt1 and Nrf2 in nucleus pulposus cells ($P<0.05$). Compared with the IL-1 β group, the high-dose Shentong Zhuyutang-containing serum+IL-1 β group showed up-regulated expression of SIRT1 and Nrf2 in nucleus pulposus cells ($P<0.05$). Compared with the high-dose Shentong Zhuyutang-containing serum+IL-1 β group, the ML385 group showed down-regulated protein levels of Nrf2 and GPX4, lowered GSH level, and elevated Fe²⁺ and MDA levels ($P<0.05$). In addition, the Ex 527 group showed down-regulated protein levels of SIRT1, Nrf2, and GPX4 ($P<0.05$). The results of the animal experiment showed that compared with the sham operation group, the model group had severe degeneration of the intervertebral disc tissue with increased pathological score, up-regulated protein level of ACSL4 ($P<0.05$), and down-regulated protein levels of SIRT1, Nrf2, GPX4, and Collagen II ($P<0.05$). Compared with the model group, the Shentong Zhuyutang group showed alleviated IDD with declined pathological score, down-regulated protein level of ACSL4 ($P<0.05$), and up-regulated protein levels of SIRT1, Nrf2, GPX4, and Collagen II ($P<0.05$). **Conclusion:** Shentong Zhuyutang may activate the SIRT1/Nrf2 signaling pathway to inhibit the ferroptosis of nucleus pulposus cells, thereby delaying the process of IDD in rats.

[Keywords] Shentong Zhuyutang; intervertebral disc degeneration; nucleus pulposus cells; ferroptosis; silent information regulator 1 (SIRT1)/nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) signaling pathway

椎间盘退变(IDD)是临床上引起腰痛最常见的原因^[1]。IDD的发病率随着现代社会化进程的加快而逐年增加,不仅严重影响患者的生活质量,也增加了社会与经济的负担^[2]。临床上针对IDD的治疗技术和方法有限,无论是保守疗法还是外科手术的方式,均无法完全阻断IDD的发生与发展病理过程^[3]。因此,探究IDD的机制,寻找更为有效安全的治疗方法显得尤为必要。

髓核细胞死亡及丢失是导致IDD的重要因素,

针对细胞死亡机制进行调控为减缓IDD提供了新的研究方向和治疗思路^[4-5]。铁死亡是一种依赖于铁离子且由膜脂质过氧化介导的细胞死亡^[6]。最近的研究表明,髓核细胞铁死亡与IDD发生与发展有密切关系^[7]。氧化应激及炎症反应的增强是导致髓核细胞铁死亡的核心触发因素。身痛逐瘀汤是清代王清任所著《医林改错》中的经典名方,其具有良好的抗氧化和抗炎功效,可有效提高退变髓核细胞的细胞活性^[8-10]。沉默信息调节因子1(SIRT1)/核

因子E₂相关因子2(Nrf2)是调节氧化应激和炎症反应的重要通路,且与细胞铁死亡的调控密切相关^[11]。本课题组前期研究发现,身痛逐瘀汤含药血清可诱导SIRT1信号通路的活化^[8]。基于此,本研究分别以髓核细胞和大鼠为研究对象,通过建立IDD细胞和大鼠模型,探究身痛逐瘀汤对IDD大鼠髓核细胞铁死亡的影响及SIRT1/Nrf2信号通路的影响。

1 材料

1.1 动物 由郑州大学实验动物中心提供SPF级SD雄性大鼠90只[实验动物生产合格证号SCXK(豫)2020-0018],体质量(200±10)g,6~7周龄。动物饲养严格遵守《实验动物管理条例》相关规定。本研究经河南省中医药大学实验动物伦理委员会的批准(HNZYY-2021004)。

1.2 试剂 胶原酶Ⅱ型和4%多聚甲醛(中国兰杰柯科技有限公司,批号分别为BS164、BL539A);DMEM高糖完全培养基、番红染色液、放射免疫沉淀法(RIPA)裂解液、4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI)溶液、苏木素-伊红(HE)染色试剂(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为2310001、G1067、R0010、C0065、20240423);白细胞介素-1 β (IL-1 β)试剂(美国PeproTech公司,批号AF-211-11B);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒、Triton X-100(美国Sigma公司,批号分别为I2393、96992);铁离子测定试剂盒、BCA蛋白定量试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为MC152L、m1095490);谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A006-2-1、A003-4-1);谷胱甘肽过氧化物酶(GPX4)、酰基辅酶A合成酶长链家族成员4(ACSL4)、Ⅱ型胶原(Collagen Ⅱ)、蛋白聚糖(Aggrecan)、核因子E₂相关因子2(Nrf2)、 β -肌动蛋白(β -actin)、沉默信息调节因子1(SIRT1)抗体(艾博抗上海贸易有限公司,批号分别为ab252833、ab155282、ab307674、ab3778、ab313825、ab179467、ab76039);生物素标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G、Alexa Fluor 488标记山羊抗兔IgG(H+L)(中国上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为A0277、A0423);驴抗兔IgG(H+L)(艾美捷科技有限公司,批号711-001-003);铁死亡抑制剂(Fer-1)、Nrf2抑制剂(ML385)、SIRT1抑制剂(Ex 527)(美国Selleck公司,批号分别为S7243、S8790、S1541);阳性药物尼美舒利分散片(规格:100 mg \times 10片,南昌飞弘药业有限公司,批号H20020196)。

1.3 仪器 VS-840K-U型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),RCO-3000-5型细胞培养箱(美国Revco公司),Spectra MaxM3型酶标仪(美国Molecular Devices公司),BX41型荧光显微镜(日本Olympus公司),TK-218型超高速离心机(美国Beckman公司),164-5050型蛋白电泳仪及170-3930型转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

1.4 药物 身痛逐瘀汤包含秦艽(240301)3 g、川芎(231101)6 g、桃仁(24031701)9 g、红花(240101)9 g、甘草(24041402)6 g、羌活(231201)3 g、没药(23111601)6 g、当归(C116231201)9 g、炒灵脂(230603)6 g、香附(220501)3 g、川牛膝(231201)9 g、地龙(24051001)6 g。饮片由河南省中医院提供,由河南省中医院副主任药师焦伟杰鉴定均为正品。加8倍纯水浸泡2 h,煎煮2次,每次30 min,将2次煎煮所得药液过滤并混合后浓缩至1 mL原液等于1 g生药,储存4 $^{\circ}$ C备用。大鼠灌胃剂量按体质量计算,10 mL \cdot kg⁻¹。

2 方法

2.1 含药血清制备 身痛逐瘀汤含药血清的制备方法参考文献[8-9],具体如下:将40只SD雄性大鼠随机分为4组,每组10只,空白组给予生理盐水灌胃,身痛逐瘀汤低、中、高剂量组分别给予身痛逐瘀汤3.38、6.75、13.5 g \cdot kg⁻¹灌胃,均2次/d,连续7 d(根据《药理实验方法学》按人与大鼠等效剂量进行换算)。末次给药2 h后取大鼠腹主动脉血5 mL/只,静置30 min(室温),离心(2 000 r \cdot min⁻¹,半径10 cm,下同,10 min),收集血清,冻存于-80 $^{\circ}$ C冰箱备用。

2.2 髓核细胞分离及IDD细胞模型的构建 取SD大鼠10只乙醚麻醉后颈椎脱臼处死,无菌条件下解剖大鼠,暴露腰椎,取出椎间盘并分离髓核组织,剪碎组织进行研磨后加入胶原酶Ⅱ型,均匀混合后消化1 h(37 $^{\circ}$ C),200目滤网过滤后离心5 min获取细胞沉淀(4 $^{\circ}$ C,1 500 r \cdot min⁻¹),使用含10%胎牛血清和双抗的DMEM高糖完全培养基均匀混合后以1 \times 10⁵个/mL的密度接种于培养瓶中常规培养。传代2次,待细胞形态呈多边形或三角形形态,则大鼠椎间盘髓核细胞体外分离培养成功。髓核细胞退变是引起IDD的病理基础。IL-1 β 作为促炎因子,能够抑制髓核细胞增殖,减弱髓核细胞的合成能力,促进胞外基质蛋白(Aggrecan和Collagen Ⅱ)的分解,最终加速IDD。因此,本研究采用根据前期研究报告,采用10 μ g \cdot L⁻¹的IL-1 β 处理髓核细胞,用于IDD细胞模型的构建^[12]。

2.3 体外研究

2.3.1 细胞的分组及处理 ①为探究身痛逐瘀汤含药血清对退变髓核细胞增殖的影响。采用 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IL-1 β 处理来构建髓核细胞退变模型。分别加入不同剂量身痛逐瘀汤含药血清(10%含药血清处理同时用含 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IL-1 β 处理)和铁死亡抑制剂(Fer-1)($1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Fer-1和 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IL-1 β 共同处理),处理时间为24 h。②为研究身痛逐瘀汤含药血清对IL-1 β 致髓核细胞铁死亡的影响,将细胞分为空白组、身痛逐瘀汤高剂量含药血清组、IL-1 β 组、身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组。③为研究SIRT1/Nrf2在身痛逐瘀汤含药血清调控髓核细胞铁死亡中的作用,在IL-1 β 和身痛逐瘀汤高剂量含药血清处理的同时,分别加入SIRT1抑制剂Ex 527(细胞先用 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Ex 527预处理4 h,随后再用 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IL-1 β 和身痛逐瘀汤高剂量含药血清继续处理24 h)和Nrf2抑制剂ML385(细胞先用 $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的ML385预处理1 h,随后再用 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的IL-1 β 和身痛逐瘀汤高剂量含药血清继续处理24 h)。

2.3.2 CCK-8法检测细胞活力 以 5×10^3 个/孔的密度培养于96孔板内,待细胞贴壁后试剂盒检测细胞活力。酶标仪检测细胞在450 nm波长条件下的吸光度 A 。增殖活力 $=\frac{(A_{\text{阴性组}}-A_{\text{实验组}})}{A_{\text{阴性组}}}\times 100\%$ 。

2.3.3 EdU染色法检测细胞增殖 以 1×10^5 个/孔的密度培养于6孔板内,常规处理48 h后每孔加入 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的EdU试剂孵育6 h(37 °C、5% CO₂),4%多聚甲醛固定45 min,按照试剂盒说明书进行操作,DAPI染液染色细胞核5 min后在荧光显微镜下拍照分析(红染细胞为增殖细胞,蓝染细胞为全部细胞)。

2.3.4 比色法检测Fe²⁺、GSH、MDA含量 根据相对应的试剂盒说明书进行操作,每个样品3个复孔,用酶标仪分别在波长590、240、532 nm条件下测定 A ,用于计算Fe²⁺、GSH、MDA水平。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤髓核细胞后加入含1% PMSF的RIPA裂解液100 μL 于冰上反应30 min,提取蛋白,离心后收集上清液(4 °C,12 000 r $\cdot\text{min}^{-1}$,30 min)。BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白含量。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离蛋白,转膜完成后使用5%的脱脂牛奶封闭1 h(室温),分别加入GPX4、ACSL4、Collagen II、Aggrecan、Nrf2、SIRT1(1:1 000)和

β -actin(1:4 000),摇床孵育过夜(4 °C),TBST洗膜3次后加入HRP标记的二抗IgG(1:2 000),孵育1 h后加入ECL显影液进行显影(室温)。曝光并使用Image J软件分析蛋白表达。

2.3.6 细胞免疫荧光检测蛋白表达 以 $1\times 10^5/\text{mL}$ 的密度接种于含多聚赖氨酸玻片的6孔板内(每孔2 mL)。处理结束后加入固定液进行固定,采用0.5%的Triton X-100进行通透,封闭完成后孵育SIRT1抗体(1:100)或Collagen II抗体(1:200),4 °C孵育过夜。次日孵育Alexa Fluor 488标记驴抗兔IgG(H+L)二抗(1:200),荧光显微镜下观察拍照,采用Image J软件对荧光强度进行分析。

2.4 体内研究

2.4.1 动物模型构建及标本收集 40只SD雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性药物组、身痛逐瘀汤组。通过腹腔注射1%戊巴比妥钠($40\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的方式对大鼠进行麻醉。除假手术组外,其余各组均参考周文明等^[13]的报道,使用纤维环穿刺法来构建IDD大鼠模型。术后连续3 d对大鼠注射青霉素($8\times 10^4\ \text{U}$)。造模4周后,对大鼠分别灌胃身痛逐瘀汤(生药 $13.5\ \text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)和尼美舒利分散片($0.18\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每日1次,连续4周。假手术组和模型组则大鼠则灌胃等体积的生理盐水。末次给药结束之后,通过注射戊巴比妥钠(3%, $50\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)的方式对大鼠实施安乐死,在原切口的基础上进行切开,取部分椎间盘组织在无菌生理盐水冲洗后,放入4%多聚甲醛固定液中,用于石蜡切片的制备。另外一部分则在分离髓核组织后冻存于-80 °C,用于Western blot检测。

2.4.2 HE染色观察椎间盘组织的病理变化 取出在4%多聚甲醛中固定2 d的椎间盘组织,经过乙二胺四乙酸(EDTA,10%)脱钙,放入梯度乙醇中脱水,经过二甲苯透化后进行石蜡包埋。切片(4 μm),按照HE染色流程,经过二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱水,使用苏木素染色5 min,分化液进行分化0.5 min,随后使用伊红染色2 min,待中性树脂胶封固后置于光学显微镜下观察椎间盘组织的病理变化。参照Masuda评分标准^[13],对各组大鼠椎间盘组织进行病理学评分。

2.4.3 Western blot检测髓核组织中SIRT1、Nrf2、GPX4、ACSL4和Collagen II蛋白表达 RIPA裂解液提取髓核组织蛋白,经过电泳、转膜后孵育SIRT1、Nrf2、GPX4、ACSL4和Collagen II抗体(1:1 000),孵育二抗后进行ECL显影。

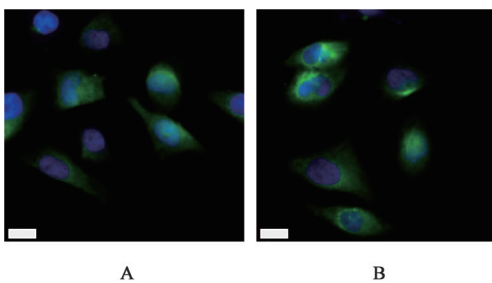
2.5 统计学分析 采用SPSS 21.0软件进行数据统计分析,所得结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验比较两组实验数据,采用单因素方差分析比较多组数据, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 身痛逐瘀汤含药血清对IL-1 β 处理髓核细胞的影响及其保护作用机制

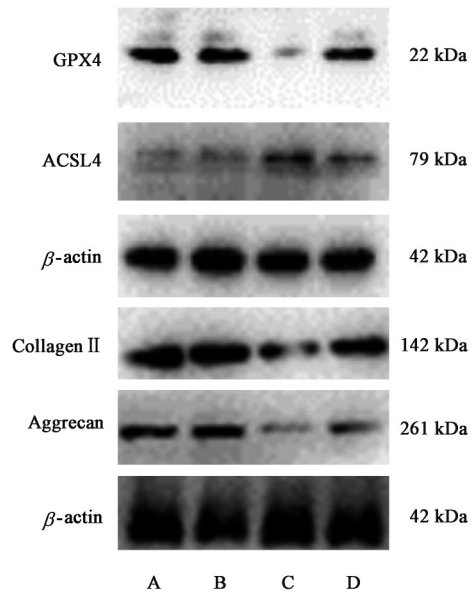
3.1.1 Fer-1对IL-1 β 处理髓核细胞铁死亡的影响

髓核细胞特异性表达Collagen II。因此,首先采用免疫荧光法检测细胞中Collagen II蛋白表达,对所分离的细胞进行鉴定。所分离的细胞中均有Collagen II蛋白表达(呈绿色荧光),表明所分离到的细胞为髓核细胞。且第一代和第三代髓核细胞中Collagen II蛋白表达差异无统计学意义。与空白组比较,IL-1 β 组大鼠髓核细胞的细胞存活率及GSH浓度明显降低($P<0.05$),Fe²⁺含量和MDA水平均明显增加($P<0.05$);与IL-1 β 组比较,Fer-1+IL-1 β 组大鼠髓核细胞的细胞存活率和GSH浓度明显升高($P<0.05$),Fe²⁺含量及MDA水平明显降低($P<0.05$)。与空白组比较,IL-1 β 组大鼠髓核细胞中GPX4蛋白水平明显降低,ACSL4蛋白水平明显升高($P<0.05$);与IL-1 β 组比较,Fer-1+IL-1 β 组大鼠髓核细胞中GPX4蛋白水平明显升高($P<0.05$),ACSL4蛋白水平明显降低($P<0.05$)。此外,与空白组比较,IL-1 β 组大鼠髓核细胞中Collagen II和Aggrecan蛋白水平明显降低($P<0.05$);与IL-1 β 组比较,Fer-1+IL-1 β 组大鼠髓核细胞中Collagen II和Aggrecan蛋白水平明显增加($P<0.05$)。见图1、图2和表1、表2。



注:A.第一代细胞;B.第三代细胞
图1 Collagen II免疫荧光染色($\times 400$)
Fig. 1 Collagen II immunofluorescence staining ($\times 400$)

3.1.2 身痛逐瘀汤含药血清对IL-1 β 处理髓核细胞增殖的影响 与空白组比较,IL-1 β 组髓核细胞活力和EdU阳性细胞率明显降低($P<0.05$);与IL-1 β 组比较,身痛逐瘀汤各剂量组髓核细胞活力和EdU阳性细胞率增加($P<0.05$)。见图3和表3。



注:A.空白组;B.Fer-1组;C.IL-1 β 组;D.Fer-1+IL-1组
图2 各组大鼠髓核细胞Collagen II、GPX4、ACSL4和Aggrecan蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of protein expressions of Collagen II, GPX4, ACSL4, and Aggrecan in rat nucleus pulposus cells in each group

表1 各组大鼠髓核细胞存活率和铁死亡指标的变化($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 1 Changes of cell viability and ferroptotic indicators in rat nucleus pulposus cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	细胞活力/%	Fe ²⁺ /mmol·g ⁻¹	GSH /mmol·g ⁻¹	MDA /μmol·g ⁻¹
空白组	100.00±3.86	4.17±0.89	28.13±2.64	2.27±0.16
Fer-1组	102.25±4.01	4.11±0.67	29.26±3.11	2.16±0.20
IL-1 β 组	54.81±3.21 ¹⁾	7.96±0.15 ¹⁾	14.39±2.23 ¹⁾	6.09±0.42 ¹⁾
Fer-1+IL-1 β 组	79.29±4.14 ²⁾	5.23±0.12 ²⁾	24.07±3.28 ²⁾	3.48±0.30 ²⁾

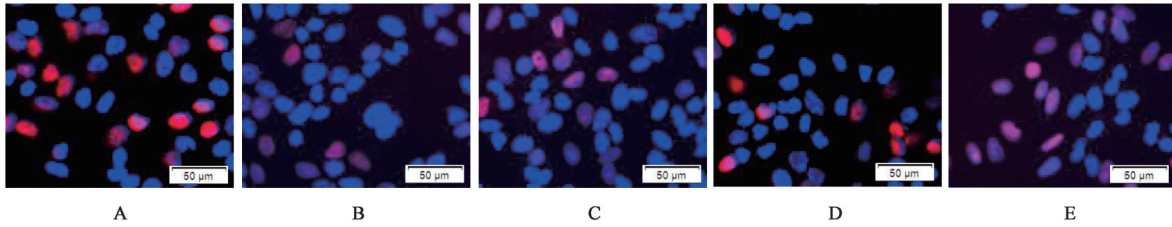
注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$;与IL-1 β 组比较²⁾ $P<0.05$ (表2和表3同)

表2 各组大鼠髓核细胞中GPX4、ACSL4、Collagen II和Aggrecan蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Protein expressions of GPX4, ACSL4, Collagen II, and Aggrecan in rat nucleus pulposus cells in each group ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	GPX4 / β -actin	ACSL4 / β -actin	Collagen II / β -actin	Aggrecan / β -actin
空白组	1.00±0.05	1.00±0.08	1.00±0.09	1.00±0.06
Fer-1组	1.02±0.07	0.99±0.05	1.02±0.08	1.01±0.09
IL-1 β 组	0.25±0.02 ¹⁾	2.68±0.16 ¹⁾	0.39±0.05 ¹⁾	0.23±0.03 ¹⁾
Fer-1+IL-1 β 组	0.81±0.06 ²⁾	1.30±0.12 ²⁾	0.80±0.07 ²⁾	0.68±0.07 ²⁾

3.1.3 身痛逐瘀汤含药血清对IL-1 β 处理髓核细胞铁死亡的影响 身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组大鼠髓核细胞中Fe²⁺含量下降,GSH浓度升高,MDA水平增加,GPX4、Collagen II和Aggrecan蛋白



注: A.空白组; B.IL-1 β 组; C.身痛逐瘀汤含药血清低剂量组; D.身痛逐瘀汤含药血清中剂量组; E.身痛逐瘀汤含药血清高剂量组
图3 各组大鼠髓核细胞EdU染色(免疫荧光, $\times 400$)

Fig. 3 Images of EdU staining in rat nucleus pulposus cells in each group (IF, $\times 400$)

表3 身痛逐瘀汤含药血清对髓核细胞活力和EdU阳性细胞率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

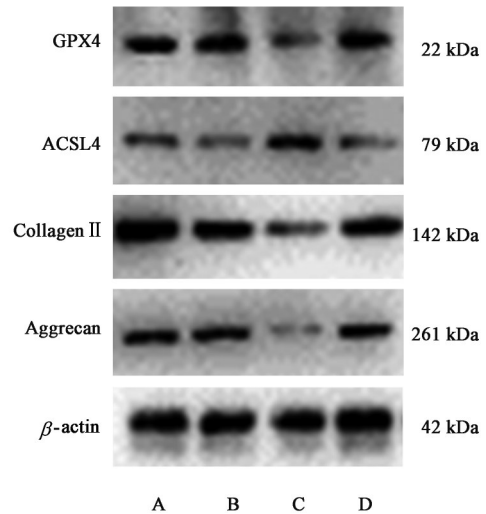
Table 3 Effect of Shentong Zhuyutang-containing serum on cell viability and EdU-positive ratio in rat nucleus pulposus cells ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	体积分数/%	细胞活力	EdU阳性细胞率
空白组		100.00 \pm 3.10	28.15 \pm 2.07
IL-1 β 组		58.72 \pm 3.36 ¹⁾	10.79 \pm 1.06 ¹⁾
身痛逐瘀汤含药血清低剂量组	10	68.03 \pm 4.27 ²⁾	14.23 \pm 1.45 ²⁾
身痛逐瘀汤含药血清中剂量组	10	80.25 \pm 4.09 ²⁾	18.01 \pm 1.86 ²⁾
身痛逐瘀汤含药血清高剂量组	10	85.06 \pm 5.01 ²⁾	22.52 \pm 2.23 ²⁾

水平增加, ACSL4蛋白水平降低, 与IL-1 β 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表4、图4。

3.1.4 Nrf2在身痛逐瘀汤含药血清调控髓核细胞GPX4表达和铁死亡中的作用 与空白组比较, IL-1 β 组髓核细胞中Nrf2和GPX4蛋白水平降低($P < 0.05$); 与IL-1 β 组比较, 身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组髓核细胞中Nrf2和GPX4蛋白水平升高($P < 0.05$); ML385组髓核细胞中Nrf2和GPX4蛋白水平降低, Fe²⁺含量升高, GSH浓度减少, MDA水平增加, 与身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组比较有差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表5和图5。

3.1.5 身痛逐瘀汤含药血清对髓核细胞SIRT1、Nrf2和GPX4蛋白表达的影响 与空白组比较, IL-1 β 组大鼠髓核细胞中SIRT1蛋白表达水平降低($P < 0.05$); 与IL-1 β 组比较, 身痛逐瘀汤高剂量含药血清组大鼠髓核细胞中SIRT1蛋白表达水平升高($P < 0.05$); 与身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组比较, Ex 527组大鼠髓核细胞中SIRT1、Nrf2和



注: A.空白组; B.身痛逐瘀汤含药血清高剂量组; C.IL-1 β 组; D.身痛逐瘀汤含药血清高剂量+IL-1 β 组

图4 各组大鼠髓核细胞GPX4、ACSL4、Collagen II和Aggrecan蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of protein expressions of GPX4, ACSL4, Collagen II, and Aggrecan in rat nucleus pulposus cells in each group

表4 身痛逐瘀汤含药血清对大鼠髓核细胞铁死亡指标的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Shentong Zhuyutang-containing serum on cell viability and ferroptotic indicators in rat nucleus pulposus cells in each group ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	Fe ²⁺ /mmol·g ⁻¹	GSH/mmol·g ⁻¹	MDA/ μ mol·g ⁻¹	GPX4/ β -actin	ACSL4/ β -actin
空白组		3.75 \pm 0.21	30.29 \pm 2.27	2.57 \pm 0.18	1.00 \pm 0.09	1.00 \pm 0.07
IL-1 β 组		7.31 \pm 0.50	14.07 \pm 1.35	6.73 \pm 0.54	0.28 \pm 0.04	2.75 \pm 0.19
身痛逐瘀汤含药血清高剂量组	10	3.66 \pm 0.30	30.48 \pm 1.91	2.49 \pm 0.23	1.03 \pm 0.06	0.97 \pm 0.10
身痛逐瘀汤含药血清高剂量+IL-1 β 组	10	4.49 \pm 0.42 ¹⁾	25.28 \pm 2.06 ¹⁾	3.31 \pm 0.40 ¹⁾	0.88 \pm 0.07 ¹⁾	1.25 \pm 0.15 ¹⁾

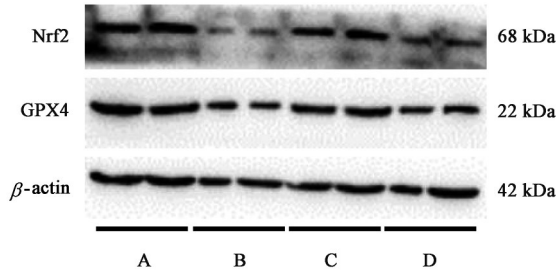
注: 与IL-1 β 组比较¹⁾ $P < 0.05$

表5 Nrf2在身痛逐瘀汤含药血清调控髓核细胞铁死亡中的作用 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Role of Nrf2 in regulation of ferroptosis in nucleus pulposus cells by Shentong Zhuyutang-containing serum ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	Nrf2/ β -actin	GPX4/ β -actin	Fe ²⁺ /mmol·g ⁻¹	GSH/mmol·g ⁻¹	MDA/ μ mol·g ⁻¹
空白组		1.00±0.08	1.00±0.07	3.25±0.17	33.65±2.84	3.05±0.19
身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组	10	0.89±0.11 ²⁾	0.84±0.09 ²⁾	4.11±0.27 ²⁾	27.09±2.15 ²⁾	3.72±0.28 ²⁾
IL-1 β 组		0.31±0.04 ¹⁾	0.30±0.03 ¹⁾	7.08±0.49 ¹⁾	13.18±1.41 ¹⁾	6.94±0.45 ¹⁾
ML385组	10	0.39±0.05 ³⁾	0.48±0.06 ³⁾	5.94±0.35 ³⁾	18.42±1.86 ³⁾	5.63±0.37 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与IL-1 β 组比较²⁾P<0.05;与身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组比较³⁾P<0.05(表6同)



注:A.空白组;B.IL-1 β 组;C.身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组;D.ML385组

图5 各组大鼠髓核细胞中Nrf2和GPX4蛋白表达

Fig. 5 Protein expressions of Nrf2 and GPX4 in rat nucleus pulposus cells in each group

GPX4蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。见表6和图6、图7。

3.2 身痛逐瘀汤对IDD大鼠的保护作用及其对SIRT1/Nrf2通路的影响

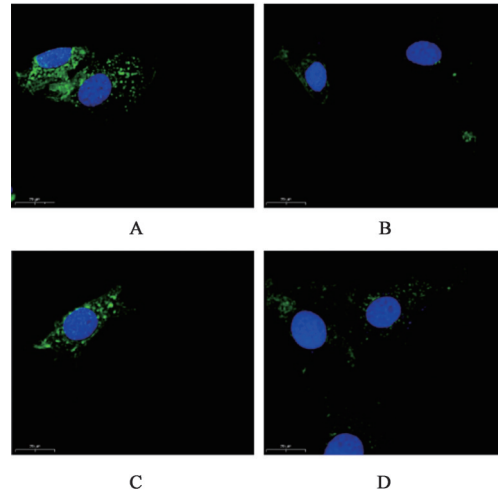
3.2.1 身痛逐瘀汤对IDD大鼠椎间盘病理变化和病理评分的影响 假手术组大鼠椎间盘结构完整清晰,髓核组织与纤维环的结构未见有异常;与假手术组比较,模型组大鼠椎间盘髓核细胞的数量明显降低,且纤维环的排列出现紊乱,组织病理学评分明显升高($P<0.05$);与模型组比较,身痛逐瘀汤组和尼美舒利组大鼠椎间盘病理变化得到有效缓解,病理评分明显降低($P<0.05$)。见图8和表7。

3.2.2 身痛逐瘀汤对IDD大鼠髓核组织中SIRT1、Nrf2、GPX4和Collagen II蛋白表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠髓核组织中SIRT1、Nrf2、GPX4和Collagen II蛋白水平明显降低,ACSL4蛋

表6 身痛逐瘀汤含药血清对大鼠髓核细胞SIRT1、Nrf2和GPX4蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Shentong Zhuyutang-containing serum on protein expressions of SIRT1, Nrf2, and GPX4 in rat nucleus pulposus cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	体积分数/%	SIRT1相对荧光强度	SIRT1/ β -actin	Nrf2/ β -actin	GPX4/ β -actin
空白组		1.00±0.09	1.00±0.11	1.00±0.07	1.00±0.10
IL-1 β 组		0.39±0.05 ¹⁾	0.21±0.01 ¹⁾	0.27±0.02 ¹⁾	0.30±0.04 ¹⁾
身痛逐瘀汤含药血清高剂量+IL-1 β 组	10	0.89±0.08 ²⁾	0.87±0.07 ²⁾	0.83±0.09 ²⁾	0.85±0.11 ²⁾
Ex 527组	10	0.43±0.04 ³⁾	0.25±0.02 ³⁾	0.38±0.04 ³⁾	0.40±0.05 ³⁾



注:A.空白组;B.IL-1 β 组;C.身痛逐瘀汤高剂量含药血清+IL-1 β 组;D.Ex 527组(图7同)

图6 身痛逐瘀汤含药血清对大鼠髓核细胞SIRT1的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 6 Effect of Shentong Zhuyutang-containing serum on SIRT1 in rat nucleus pulposus cells (IF, ×400)

白水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,身痛逐瘀汤组和尼美舒利组大鼠髓核组织中SIRT1、Nrf2、GPX4和Collagen II蛋白水平升高,ACSL4蛋白水平明显降低($P<0.05$)。见图9和表8。

4 讨论

IDD的主要特征是髓核细胞数目的减少及细胞外基质的降解。抑制髓核细胞死亡及改善细胞外基质降解,对于延缓IDD有着重要的意义^[14]。IL-1 β 是引起IDD的关键因子,过量的IL-1 β 可降低髓核细胞存活,诱导细胞外基质的降解^[15]。因此,IL-1 β

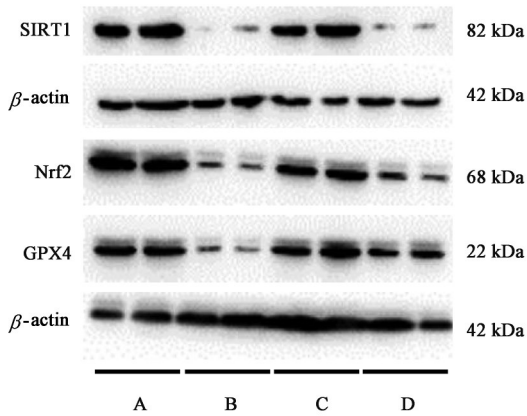


图7 各组髓核细胞 SIRT1、Nrf2 和 GPX4 蛋白表达电泳
Fig. 7 Electrophoresis of protein expressions of SIRT1, Nrf2, and GPX4 in rat nucleus pulposus cells in each group

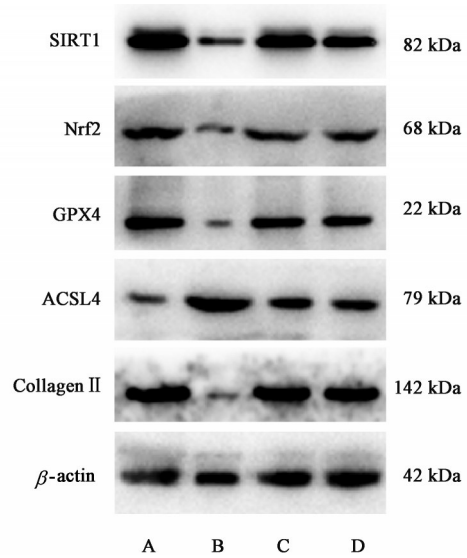
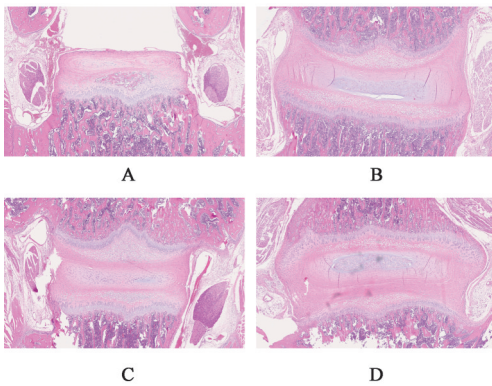


图9 各组大鼠髓核组织中 SIRT1、Nrf2、GPX4、ACSL4 和 Collagen II 蛋白表达电泳
Fig. 9 Electrophoresis of SIRT1, Nrf2, GPX4, ACSL4, and Collagen II protein expressions in rat nucleus pulposus in each group



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 身痛逐瘀汤组; D. 尼美舒利组 (图9同)

图8 身痛逐瘀汤对大鼠椎间盘组织的影响 (HE, ×200)
Fig. 8 Effect of Shentong Zhuyutang on rat intervertebral disc in rat (HE, ×200)

表7 身痛逐瘀汤对大鼠椎间盘组织病理学评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)
Table 7 Effect of Shentong Zhuyutang on pathological score of rat intervertebral disc ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	组织病理评分/分
假手术组		4.23±0.35
模型组		11.19±0.62 ¹⁾
身痛逐瘀汤组	13.5	6.88±0.52 ²⁾
尼美舒利组	1.8×10 ⁻⁴	7.21±0.60 ²⁾

注: 与假手术组比较¹⁾P<0.05; 与模型组比较²⁾P<0.05(表8同)

表8 身痛逐瘀汤对大鼠髓核组织中 SIRT1、Nrf2、GPX4、ACSL4 和 Collagen II 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	SIRT1/β-actin	Nrf2/β-actin	GPX4/β-actin	ACSL4/β-actin	Collagen II /β-actin
假手术组		1.00±0.09	1.00±0.07	1.00±0.05	1.00±0.10	1.00±0.08
模型组		0.31±0.04 ¹⁾	0.38±0.03 ¹⁾	0.27±0.03 ¹⁾	3.61±0.19 ¹⁾	0.22±0.02 ¹⁾
身痛逐瘀汤组	13.5	0.88±0.11 ²⁾	0.80±0.09 ²⁾	0.85±0.07 ²⁾	2.02±0.15 ²⁾	0.90±0.13 ²⁾
尼美舒利组	1.8×10 ⁻⁴	0.70±0.06 ²⁾	0.73±0.05 ²⁾	0.82±0.10 ²⁾	1.93±0.14 ²⁾	0.84±0.09 ²⁾

常被用于 IDD 体外细胞模型的构建^[16]。本研究结果表明, IL-1β 抑制了大鼠髓核细胞的增殖, 基质大分子 Collagen II 和 Aggrecan 表达水平降低, 表明 IDD 细胞模型构建成功。身痛逐瘀汤以红花、桃仁、川芎、当归为君药, 活血化瘀, 臣以羌活、秦艽祛风除湿、舒筋活络, 五灵脂、没药行气止痛, 又加香附活血止痛, 气血双行, 使止痛效果更佳, 佐以地龙利水通络而通利关节, 牛膝补肝肾、强筋骨更有扶正之功; 使以甘草调和诸药, 全方对迁延不愈之肩、臂、腰、腿及周身疼痛效如桴鼓^[17-19]。身痛逐瘀汤中的有效活性成分, 能逆转 IL-1β 诱导的髓核细胞 Collagen II 和 Aggrecan 降解, 从而发挥改善 IDD 的作用^[15, 20]。本研究采用身痛逐瘀汤含药血清干预, 发现其能有效缓解 IL-1β 诱导的髓核细胞基质降解, 维持细胞增殖活性, 其作用效果与身痛逐瘀汤的剂量呈正相关。此外, 进一步研究发现, 身痛逐瘀汤干预后 IDD 大鼠椎间盘髓核组织中 Collagen II 蛋白水平及髓核细胞数目增加, 组织病理损伤明显

降低。这些研究结果表明,身痛逐瘀汤能抑制髓核细胞数目的减少和细胞外基质的降解,从而有效缓解IDD的过程。

铁死亡作为一种新的细胞死亡方式。其典型特征是铁离子代谢失调和脂质过氧化产物的积累^[21]。最新的研究表明,髓核细胞铁死亡参与了IDD的发生与发展过程^[22]。在细胞铁死亡的过程中,伴随着铁死亡重要指标 Fe^{2+} 含量及细胞膜多不饱和脂肪酸代谢同工酶ACSL4表达的升高^[23]。脂质过氧化损伤(如脂质过氧化产物MDA含量增加,GSH水平的耗竭)是铁死亡的执行因子^[24]。发现IL-1 β 处理的髓核细胞中 Fe^{2+} 和MDA含量增加,ACSL4蛋白水平升高,GSH水平降低。提示IL-1 β 对细胞增殖的抑制作用可能与其诱导铁死亡有关。铁死亡抑制剂Fer-1可有效逆转IL-1 β 对髓核细胞 Fe^{2+} 、MDA、GSH及ACSL4水平的影响,细胞活力显著升高。这些结果表明,铁死亡参与了IL-1 β 诱导的髓核细胞死亡。身痛逐瘀汤含药血清能逆转IL-1 β 对髓核细胞铁死亡的影响。以及降低IDD大鼠髓核组织中的ACSL4蛋白水平。这些结果表明,身痛逐瘀汤对IDD的保护作用可能与其抑制髓核细胞铁死亡有关。

GPX4可以使氧化的细胞膜多不饱和脂肪酸还原成没有毒性的脂质,从而起到抑制铁死亡的作用^[25-26]。在IDD过程中,受损髓核细胞中GPX4表达水平降低。上调GPX4的表达则会促进髓核细胞增殖和细胞外基质的合成,从而延缓了IDD的进程^[27]。研究结果发现,IL-1 β 处理的髓核细胞及IDD大鼠髓核组织中均伴随着GPX4水平的降低。身痛逐瘀汤含药血清处理上调了髓核细胞中GPX4的表达,提示GPX4是身痛逐瘀汤抑制髓核细胞铁死亡的关键调控蛋白。SIRT1和Nrf2是髓核细胞内稳态的重要调控因子^[28-29]。SIRT1作为一种去乙酰化酶,可参与细胞炎症反应、氧化应激及铁死亡等多种病理和生理过程的调控^[8,30]。本课题组前期研究结果表明,身痛逐瘀汤能够促进SIRT1的表达^[8]。Nrf2是细胞中调节抗氧化反应的关键蛋白,也是GPX4的上游靶基因^[31]。SIRT1通过激活Nrf2来起到抑制细胞铁死亡的作用^[11]。然而,SIRT1/Nrf2通路在身痛逐瘀汤改善IDD中的作用尚不清楚。本研究结果表明,IDD大鼠髓核组织和IL-1 β 处理的髓核细胞中均观察到SIRT1和Nrf2蛋白表达水平的降低。身痛逐瘀汤干预后,受损髓核组织和细胞中SIRT1和Nrf2蛋白水平增加。Ex 527(SIRT1抑制

剂)和ML385(Nrf2特异性抑制剂)减弱了身痛逐瘀汤对IL-1 β 处理髓核细胞铁死亡的影响。因此,身痛逐瘀汤可以缓解IDD髓核细胞铁死亡,其作用机制可能与诱导SIRT1/Nrf2信号通路活化有关。

综上所述,身痛逐瘀汤含药血清可以抑制IDD大鼠髓核细胞铁死亡,这种保护可能与其激活SIRT1/Nrf2信号通路有关。本研究为身痛逐瘀汤临床防治IDD提供了理论与研究依据。后续将采用SIRT1和Nrf2特异性的抑制剂,进一步从体内验证SIRT1/Nrf2信号通路在身痛逐瘀汤在干预IDD中所发挥的具体作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] ADAMS M A, ROUGHLEY P J. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? [J]. SPINE, 2006, 31(18): 2151-2161.
- [2] VOS T, FLAXMAN A D, NAGHAVI M, et al. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990—2010: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010 [J]. Lancet, 2012, 380(9859): 2163-2196.
- [3] XIN J, WANG Y, ZHENG Z, et al. Treatment of intervertebral disc degeneration [J]. Orthop Surg, 2022, 14(7): 1271-1280.
- [4] 刘晏东, 邓强, 陈博, 等. 白介素-1 β 在椎间盘退变中的作用及中药干预的研究进展 [J]. 上海中医药杂志, 2024, 58(7): 95-100.
LIU Y D, DENG Q, CHEN B, et al. The role of interleukin-1 β in intervertebral disc degeneration and research progress of traditional Chinese medicine interventions [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2024, 58(7): 95-100.
- [5] 熊治林, 孙红, 刘森, 等. 铁死亡在椎间盘退变和骨关节炎中的作用 [J]. 中国组织工程研究, 2023, 27(36): 5884-5890.
XIONG Z L, SUN H, LIU M, et al. Roles of ferroptosis in intervertebral disc degeneration and osteoarthritis [J]. J Clin Rehabil Tis Eng Res, 2023, 27(36): 5884-5890.
- [6] 郭孝静, 秦欢, 项栋良, 等. 铁死亡在骨关节炎中的作用及中医药干预研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(19): 263-272.
GUO X J, QIN H, XIANG D L, et al. Role of ferroptosis in osteoarthritis and traditional Chinese medicine intervention: A review [J]. Chi J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(19): 263-272.
- [7] DOU X, MA Y, LUO Q, et al. Therapeutic potential of melatonin in the intervertebral disc degeneration through inhibiting the ferroptosis of nucleus pulposus cells [J]. J Cell Mol Med, 2023, 27(16): 2340-2353.
- [8] 王政臻, 黄俊卿, 杨彬, 等. 基于AMPK/Sirt1信号通路探讨身痛逐瘀汤含药血清对膝骨性关节炎大鼠软骨细胞的保护

- 作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(16):33-42.
- WANG Z Z, HUANG J Q, YANG B, et al. Protective effect of Shentong Zhuyutang-containing serum on chondrocytes in rats with knee osteoarthritis based on AMPK/Sirt1 signaling pathway[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2023, 29(16): 33-42.
- [9] 芦冲, 栗丽丽, 马旭凯, 等. 身痛逐瘀汤含药血清通过NF- κ B通路抑制TNF- α 诱导的大鼠髓核细胞退变的作用机制[J]. 现代中西医结合杂志, 2023, 32(22):3074-3078, 3086.
- LU C, LI L L, MA X K, et al. Mechanism of medicated serum of Shentong Zhuyu decoction in inhibiting TNF- α -induced degeneration of rat myeloid nucleus via NF- κ B pathway[J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2023, 32(22): 3074-3078, 3086.
- [10] 刘志超, 张帆, 孙旗, 等. 身痛逐瘀汤对静水压下人髓核细胞凋亡和基质相关蛋白表达的影响[J]. 世界中医药, 2020, 15(8):1108-1113.
- LIU Z C, ZHANG F, SUN Q, et al. Effects of Shentong Zhuyu decoction on autophagy, matrix related genes and expression of Sox9 and Collagen I in human nucleus pulposus cells under hydrostatic pressure[J]. World Chin Med, 2020, 15(8):1108-1113.
- [11] 胡晓英, 吴建发, 王鹰, 等. 汉黄芩素调节SIRT1/Nrf2信号通路对子宫内异位症大鼠铁死亡的影响[J]. 遵义医科大学学报, 2023, 46(10):943-949.
- HU X Y, WU J F, WANG Y, et al. Impact of wogonin on ferroptosis in endometriosis rats by regulating SIRT1/Nrf2 signaling pathway[J]. J Zunyi Med Univ, 2023, 46(10): 943-949.
- [12] 吴高臣, 陈金鹏, 孟凡剑, 等. XIST对椎间盘退变大鼠髓核细胞增殖及细胞外基质合成的影响及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(7):823-831.
- WU G C, CHEN J P, MENG F J, et al. Influences and mechanism of XIST on proliferation and extracellular matrix synthesis of nucleus pulposus cells in rats with intervertebral disc degeneration[J]. Med J Chin PLA, 2024, 49(7):823-831.
- [13] 周文明, 林一峰, 张震, 等. 补肾壮督方对大鼠退变椎间盘细胞线粒体凋亡通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(19):25-31.
- ZHOU W M, LIN Y F, ZHANG Z, et al. Effect of Bushen Zhuangdu recipe on mitochondrial apoptotic pathway in degenerative intervertebral disc cells in rats[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2019, 25(19):25-31.
- [14] COSTĂCHESCU B, NICULESCU A G, TELEANU R I, et al. Recent advances in managing spinal intervertebral discs degeneration[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(12):6460.
- [15] JIN H, WANG Q, WU J, et al. Baicalein inhibits the IL-1 β -induced inflammatory response in nucleus pulposus cells and attenuates disc degeneration *in vivo* [J]. Inflammation, 2019, 42(3):1032-1044.
- [16] HE J, YANG J, SHEN T, et al. Overexpression of long non-coding RNA XIST promotes IL-1 β -induced degeneration of nucleus pulposus cells through targeting miR-499a-5p [J]. Mol Cell Probes, 2021, 57:101711.
- [17] 陈国华. 身痛逐瘀汤治疗膝关节骨性关节炎的疗效探讨[J]. 中国实用医药, 2020, 15(19):155-157.
- CHEN G H. Discussion on the efficacy of Shentong Zhuyu decoction in the treatment of osteoarthritis of knee joints [J]. China Practical Medicine, 2020, 15(19): 155-157.
- [18] 杨国华, 温松江. 身痛逐瘀汤结合理筋手法治疗腰椎间盘突出症临床观察[J]. 实用中医药杂志, 2021, 37(5):756-757.
- YANG G H, WEN S J. Clinical observation on the treatment of lumbar intervertebral disc herniation by combining Shentong Zhuyu decoction with reinforcement manipulation [J]. J Pract Tradit Chin Med, 2021, 37(5):756-757.
- [19] 崔岩, 徐嘉. 身痛逐瘀汤, 推拿及针灸联合治疗腰椎间盘突出症的临床效果[J]. 中医临床研究, 2021, 13(2):91-93.
- CUI Y, XU J. Efficacy of the Shentong Zhuyu decoction plus massage and acupuncture on lumbar intervertebral disc herniation[J]. Clin J Chin Med, 2021, 13(2):91-93.
- [20] SHAO Z, WANG B, SHI Y, et al. Senolytic agent Quercetin ameliorates intervertebral disc degeneration via the Nrf2/NF- κ B axis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2021, 29(3): 413-422.
- [21] LI J, CAO F, YIN H L, et al. Ferroptosis: Past, present and future[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(2):88.
- [22] 郑丹扬, 罗敏捷, 徐卫星, 等. 铁死亡在腰椎间盘突出退变中的作用研究进展[J]. 中国现代医生, 2024, 62(9):103-106.
- ZHENG D Y, LUO M J, XU W X, et al. Progress in the study of the role of iron death in the degeneration of lumbar intervertebral discs [J]. Chin Mod Doc, 2024, 62(9): 103-106.
- [23] ZHANG H L, HU B X, LI Z L, et al. PKC β II phosphorylates ACSL4 to amplify lipid peroxidation to induce ferroptosis[J]. Nat Cell Biol, 2022, 24(1):88-98.
- [24] MA C, WU X, ZHANG X, et al. Heme oxygenase-1 modulates ferroptosis by fine-tuning levels of intracellular iron and reactive oxygen species of macrophages in response to Bacillus Calmette-Guerin infection [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12:1004148.
- [25] MIAO Y, CHEN Y, XUE F, et al. Contribution of ferroptosis and GPX4's dual functions to osteoarthritis progression[J]. EBioMedicine, 2022, 76:103847.
- [26] XUE Q, YAN D, CHEN X, et al. Copper-dependent autophagic degradation of GPX4 drives ferroptosis [J]. Autophagy, 2023, 19(7):1982-1996.
- [27] JIA C, XIANG Z, ZHANG P, et al. Selenium-SeIK-GPX4 axis protects nucleus pulposus cells against mechanical overloading-induced ferroptosis and attenuates senescence of intervertebral disc[J]. Cell Mol Life Sci, 2024, 81(1):49.
- [28] 寇裕, 顾勇, 陈亮. 黑磷调控氧化应激-炎症级联效应延缓椎间盘退变的机制[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(15): 2338-2345.

- KOU Y, GU Y, CHEN L. Mechanism of black phosphorus regulating oxidative stress-inflammation cascade in retarding intervertebral disc degeneration [J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*, 2024, 28(15): 2338-2345.
- [29] 陆恩辉, 李庆妹, 谭云. Kallistatin 诱导 SIRT1 表达抑制人髓核细胞凋亡及细胞外基质降解 [J]. *陆军军医大学学报*, 2022, 44(23): 2421-2428.
- LU E H, LI Q S, TAN Y. Kallistatin inhibits apoptosis and extracellular matrix degradation of human nucleus pulposus cells by inducing SIRT1 expression [J]. *J Army Med Univ*, 2022, 44(23): 2421-2428.
- [30] 刘旭雯, 孙红, 彭国璇, 等. 沉默信息调节因子 1 在椎间盘退变中作用的研究进展 [J]. *中国骨与关节杂志*, 2022, 11(10): 786-791.
- LIU X W, SUN H, PENG G X, et al. The emerging roles of SIRT1 in the degeneration of intervertebral disc [J]. *Chin J Bone Jt*, 2022, 11(10): 786-791.
- [31] 陈海伟, 刘明强, 张广智, 等. 核因子 E₂ 相关因子 2 在椎间盘退变中的作用 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2022, 30(4): 337-342.
- CHEN H W, LIU M Q, ZHANG G Z, et al. Role of nuclear factor E₂ related factor 2 in intervertebral disc degeneration [J]. *Orthop J Chin*, 2022, 30(4): 337-342.

[责任编辑 周冰冰]