

补肾壮筋汤抑制椎间盘退变的机制研究

林锦泽, 章宏杰, 廖英姿, 王楚茜, 余紫薇, 张加芳*

福建中医药大学附属第二人民医院脊柱外科, 福建 福州

收稿日期: 2025年3月3日; 录用日期: 2025年3月26日; 发布日期: 2025年4月7日

摘要

目的: 探讨补肾壮筋汤调控细胞外基质重塑延缓椎间盘退变的作用机制。方法: 选取2月龄SPF级雄性SD大鼠共35只, 随机分为即对照组(6只)和造模组(24只)。对照组行假手术处理, 造模组采用椎间盘穿刺法建立动物模型, 通过MRI扫描, 验证椎间盘退变大鼠模型构建是否成功。将造模成功的大鼠随机分为: 模型组、低剂量中药组、中剂量中药组、高剂量中药组, 每组各6只。根据人体与动物药物等效剂量换算方法及前期实验研究, 给药剂量为: 低剂量组0.8 g/kg/天, 中剂量组1.6 g/kg/天, 高剂量组3.2 g/kg/天。从术后第2天开始, 中药组分别给予不同浓度的补肾壮筋汤灌胃, 对照组和模型组则予等量的生理盐水灌胃, 1次/d, 连续干预8周。HE染色观察各组组织形态结构的变化; qPCR、Western blot检测各组Aggrecan、Col2A1、MMP-13的mRNA转录水平和蛋白相对表达量。结果: ① HE染色显示对照组椎间盘组织形态完整, 结构清晰, 髓核与纤维环间界限清晰, 可见丰富的细胞外基质和大量髓核细胞; 模型组椎间盘高度明显降低, 髓核组织细胞外基质和髓核细胞明显减少, 纤维软骨细胞排列紊乱; 随着补肾壮筋汤剂量的增加, 椎间盘高度明显升高, 髓核细胞和髓核中基质均增多, 纤维软骨细胞排列趋于整齐。② qPCR、Western blot结果显示, 椎间组织中Aggrecan、Col2A1的表达量, 模型组显著低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 补肾壮筋汤组显著高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$), MMP-13的表达模型组显著高于对照组($P < 0.01$), 补肾壮筋汤组显著低于模型组($P < 0.01$)。结论: 补肾壮筋汤通过升高椎间盘组织中的Aggrecan、Col2A1的含量, 降低椎间盘组织中MMP-13含量, 从而延缓椎间盘的退变。

关键词

椎间盘退变, 补肾壮筋汤, 胶原蛋白, 基质金属蛋白, 金属蛋白

Mechanism Research of Bu Shen Zhuang Jin Decoction in Inhibiting Intervertebral Disc Degeneration

Jinze Lin, Hongjie Zhang, Yingzi Liao, Chuxi Wang, Ziwei Yu, Jiafang Zhang*

Department of Spinal Surgery, The Second Affiliated Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian

*通讯作者。

文章引用: 林锦泽, 章宏杰, 廖英姿, 王楚茜, 余紫薇, 张加芳. 补肾壮筋汤抑制椎间盘退变的机制研究[J]. 临床医学进展, 2025, 15(4): 718-724. DOI: 10.12677/acm.2025.154987

Abstract

Objective: To investigate the mechanism of Bushen Zhuangjin Decoction in inhibiting intervertebral disc degeneration. **Methods:** A total of 35 SPF male SD rats aged 2 months were selected and randomly divided into control group (6 rats) and modeling group (24 rats). The control group was treated with sham operation, and the model group was treated with intervertebral disc puncture to establish an animal model. The successful construction of the rat model of intervertebral disc degeneration was verified by MRI scanning. The rats were randomly divided into Model group, low-dose medicine group, medium-dose medicine group and high-dose medicine group, with 6 rats in each group. According to the equivalent dose conversion method of human and animal drugs and the preliminary experimental study, the dosage was as follows: low-dose group 0.8 g/kg/day, mid-dose group 1.6 g/kg/day, high-dose group 3.2 g/kg/day. Starting from the second day after surgery, the medicine group was given different concentrations of Bushen Zhuangjin decoction by gavage, while the control group and the model group were given the same amount of normal saline by gavage, once a day, for continuous intervention for 8 weeks. The changes of tissue morphology and structure were observed by MRI and HE staining. The mRNA transcription levels and relative protein expression levels of Aggrecan, Col2A1 and MMP-13 in each group were detected by qPCR and Western blot. **Results:** ① HE staining showed that the intervertebral disc in the control group was complete, with clear structure, clear boundary between nucleus pulposus and annulus fibrosus, and abundant extracellular matrix and a large number of nucleus pulposus cells. In the model group, the height of intervertebral disc decreased significantly, the extracellular matrix and nucleus pulposus cells decreased significantly, and the arrangement of fibrochondrocytes was disordered. With the increase of dosage of Bushen Zhuangjin decoction group, the height of intervertebral disc increased significantly, the stroma in nucleus pulposus and nucleus pulposus increased, and the arrangement of fibrochondrocytes tended to be orderly. ② The results of qPCR and Western blot demonstrated that Aggrecan and Col2A1 expression was significantly decreased in the model group compared to the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The Bushen Zhuangjin decoction treatment led to a significant increase in the expression of both Aggrecan and Col2A1 compared to the model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conversely, the model group exhibited a significantly higher expression level of MMP-13 compared to the control group ($P < 0.01$). Bushen Zhuangjin decoction treatment resulted in a significant reduction in MMP-13 expression ($P < 0.01$). **Conclusion:** Bushen Zhuangjin decoction can increase the content of Aggrecan and Col2A1 in intervertebral disc tissue and decrease the content of MMP-13 in intervertebral disc tissue, thus delaying disc degeneration.

Keywords

Intervertebral Disc Degeneration, Bushen Zhuangjin Decoction, Collagens, MMPs, ADAMTSs

Copyright © 2025 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

腰痛(LBP)是全世界导致残疾的主要原因, 约占全球人口的 80% [1][2]。腰椎间盘突出(IVDD)是一种常见的肌肉骨骼退行性疾病, 被认为是腰痛的主要原因, 占有腰痛病例的 40%以上, 在全球范围内造成了巨大的社会经济负担[3]-[5]。椎间盘退变是引发多种脊柱疾病(如腰椎间盘突出症、颈椎病等)的关键

病理因素。椎间盘由髓核、纤维环和软骨终板构成,其细胞外基质(ECM)成分的动态平衡对维持椎间盘的结构和功能至关重要。在生理状态下,椎间盘细胞合成和分泌多种 ECM 成分,如胶原蛋白和蛋白多糖,以保持椎间盘的弹性和水合状态[6]。然而,随着年龄增长、机械负荷过度等因素的影响,椎间盘细胞活性下降,ECM 合成与分解失衡,导致椎间盘退变。早期表现为蛋白多糖含量减少、胶原纤维排列紊乱,进而引发椎间盘水分丢失、弹性下降,最终可能导致椎间盘高度降低、纤维环破裂,压迫神经根或脊髓,引发疼痛、麻木等症状[7]。

目前,椎间盘退变的临床治疗主要包括保守治疗(如药物治疗、物理治疗)和手术治疗,但这些方法大多只能缓解症状,难以从根本上修复退变的椎间盘组织[8]。因此,寻找能够调控椎间盘 ECM 成分、延缓甚至逆转椎间盘退变进程的新方法和药物具有重要意义。近年来,中药在椎间盘退变防治中的潜在价值受到关注。中药通过多成分、多靶点、多途径的作用特点,能够调节椎间盘细胞的生物学行为,促进 ECM 合成,抑制炎症反应和氧化应激[9]。

补肾壮筋汤是我院福建省名中医王和鸣教授推荐临床上治疗腰痛的常用方,疗效显著。本研究旨在深入探讨补肾壮筋汤调控椎间盘细胞外基质成分的作用机制,分析补肾壮筋汤对椎间盘细胞外基质代谢的影响,为中药在椎间盘退变防治领域的临床应用提供科学依据。

2. 材料与方法

2.1. 材料

1. 动物: SPF 级 SD 大鼠 35 只,雄性,2 月龄,购买并饲养于福建中医药大学实验动物中心。实验环境:SP F (Specific pathogen free)级动物房,室温 22℃,相对湿度 30%~40%。

2. 药物: 补肾壮筋汤配方颗粒:熟地黄 12 g、当归 12 g、茯苓 12 g、续断 12 g、山茱萸 12 g、白芍 10 g、杜仲 10 g、五加皮 10 g、川牛膝 10 g、青皮 5 g。由福建中医药大学附属第二人民医院中药颗粒室提供,同一批号密封保存备用。

2.2. 方法

1. 动物造模: 2%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,取仰卧位,备皮、消毒、铺巾及定位。以 L4/L5 椎间隙为中心,取腹正中切口,向两侧轻轻拨开腹部脏器及肌肉组织,暴露 L4/5 椎间盘。用 21 G 注射器针头平行于终板刺入椎间盘纤维环约 3 mm,停留 30 秒后缓慢拔出。最后缝合待苏醒分笼饲养。对照组不进行纤维环穿刺操作,余相同。

2. 药物干预: 从术后第 2 天开始,中药组分别按低剂量组 0.8 g/kg/天,中剂量组 1.6 g/kg/天,高剂量组 3.2 g/kg/天的补肾壮筋汤灌胃,假手术组和模型组则予等量的生理盐水灌胃,每天灌胃 1 次,持续干预 8 周。

3. 取材: 采用腹腔注射过量麻醉处死大鼠,沿上、下软骨终板与椎体的交界面完整切取大鼠尾椎椎间盘。取下的椎间盘标本于 4%多聚甲醛固定。

4. MRI 扫描: 取材前对各组大鼠进行 MRI 扫描:吸入麻醉后,将头部及腹部固定,利用动物专用线圈进行 MRI 扫描,对比药物干预前后椎间盘高度、椎间盘 T2 信号改变。

5. HE 染色: 将取下的椎间盘修剪好放入 4%的多聚甲醛固定 48 h,常规进行脱钙、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,组织切片行二甲苯 I→二甲苯 II→100%乙醇→90%乙醇→80%乙醇→蒸馏水脱蜡处理,苏木素、伊红染色后中性树胶封片,倒置显微镜下观察椎间盘组织形态结构。

6. Western Blot: 采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品与上样缓冲液混合后,煮沸 5~10 分钟。随后,蛋白样品通过 SDS-PAGE 凝胶进行分离,再通过湿转法转移到 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)上,5%

BSA 封闭 2 小时后, 用 TBST 液洗涤 3 次, 每次 5 min。加入不同的一抗(胶原 1:1000, 蛋白多糖 1:500, 基质金属蛋白酶 1:1500)孵育过夜。然后用 TBST 洗涤 3 次, 在 37℃ 下与相应的二抗孵育 1 小时。使用 Li-Cor Odyssey 9120 红外成像系统检测条带, 条带的强度通过 Image-Pro Plus 6.0 软件(美国 Media Cybernetics 公司)进行定量分析。

7. PCR: 根据试剂盒说明书, 从不同处理组的髓核(NP)细胞中提取总 RNA。随后, 将 RNA 逆转录生成 cDNA。实时定量 PCR(RT-qPCR)分析中使用了针对 I 型胶原蛋白、II 型胶原蛋白、蛋白多糖、基质金属蛋白酶-13 和 ADAMTS-5 的引物。GAPDH 作为内参基因。

8. 统计学方法: 实验数据采用 SPSS 25.0 软件包进行统计学处理, 若符合正态分布, 则采用单因素方差分析(One-Way ANOVA); 不符合者, 则采用非参数检验; 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 各组大鼠椎间盘组织 HE 染色结果

HE 染色显示: 对照组椎间盘组织形态完整, 结构清晰, 髓核与纤维环间界限清晰, 可见丰富的细胞外基质和大量髓核细胞; 与对照组相比, 模型组椎间盘高度明显降低, 髓核组织细胞外基质和髓核细胞明显减少, 纤维软骨细胞排列紊乱; 随着补肾壮筋汤组剂量的增加, 椎间盘高度明显升高, 髓核细胞和髓核中基质均增多, 纤维软骨细胞排列趋于整齐。详见图 1。

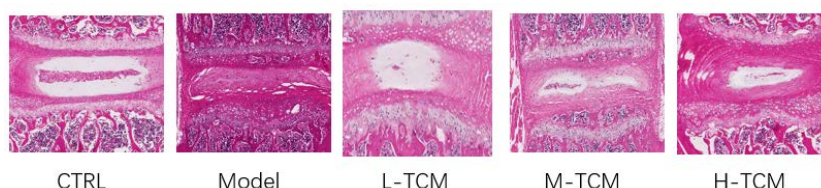


Figure 1. Observation of HE staining results of intervertebral discs in each group of rats (×100)

图 1. 各组大鼠椎间盘 HE 染色结果观察(×100)

3.2. 椎间盘组织中 Aggrecan、Col2A1、MMP-13 的蛋白表达水平

与对照组对比, 模型组椎间组织中 Aggrecan、Col2A1 的蛋白表达量显著低于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$), MMP-13 的表达模型组显著高于对照组($P < 0.01$), 补肾壮筋汤组 Aggrecan、Col2A1 显著高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 补肾壮筋汤组 MMP-13 显著低于模型组($P < 0.01$)。与 mRNA 表达水平基本一致。详见图 2。

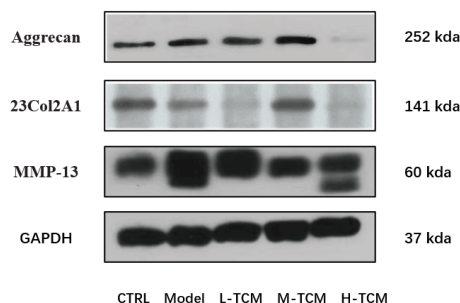
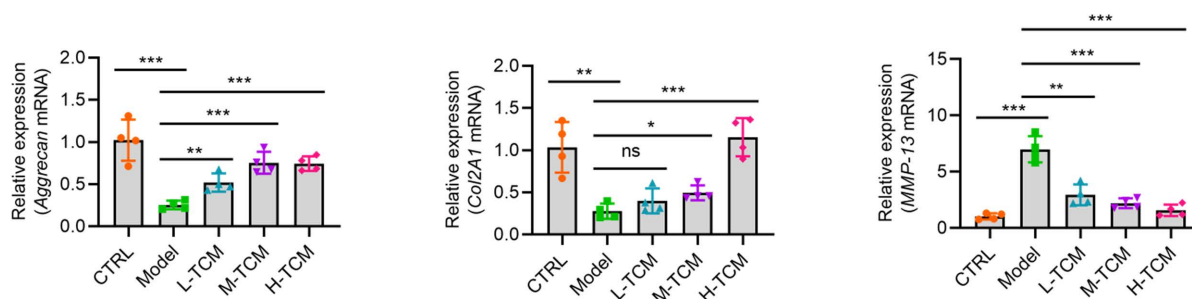


Figure 2. Expression levels of Aggrecan, Col2A1, and MMP13 proteins in intervertebral disc tissues of rats in each group

图 2. 各组大鼠椎间盘组织 Aggrecan、Col2A1、MMP13 蛋白表达水平

3.3. 椎间盘组织中 Aggrecan、Col2A1、MMP-13 的 mRNA 转录水平

与对照组对比, 模型组椎间组织中 Aggrecan、Col2A1I 的 mRNA 表达量显著低于对照组($P < 0.01$), MMP-13 的表达模型组显著高于对照组($P < 0.01$), 补肾壮筋汤组 Aggrecan、Col2A1 显著高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$), 补肾壮筋汤组 MMP-13 显著低于模型组($P < 0.01$)。详见图 3。



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

Figure 3. Expression levels of Aggrecan, Col2A1, and MMP-13 mRNA in intervertebral disc tissues of rats in each group

图 3. 各组大鼠椎间盘组织 Aggrecan、Col2A1、MMP-13 mRNA 表达水平

4. 讨论

腰痛属于中医学“痹证”范畴, 古人指出腰痛与肾关系密切[10]。《素问·脉要精微论》中记载“腰者肾之府, 转摇不能, 肾将惫矣”, 腰椎退行性疾病所导致的腰痛多为老年患者, 且大多为慢性腰痛。病机上, 老年人多以脏腑亏虚, 气血衰弱为主要特点, 肾主骨生髓的功能下降。另外, 中医同时也认为“肝”在体合筋, 其华在爪。《素问·阴阳应象大论》称“肝生筋”, 肝血充足, 则筋强力健。“肝在体合筋中”的“筋”也包括脊柱周围韧带结构。

现代医学认为, 椎间盘的稳定和机械功能跟脊柱周围的韧带密切相关, 强壮的韧带结构能够减轻椎间盘承受的应力, 避免椎间盘的损伤。人体椎间盘的营养支持与物质交换主要靠上下椎体与终板, 随着年龄的增加逐渐会出现终板钙化。终板的钙化使椎间盘细胞营养物质明显减少, 导致椎间盘细胞分泌的细胞外基质减少[11]。

基质金属蛋白酶(MMP)和具有血小板反应蛋白基序的解整合素和金属蛋白酶(ADAMTS)是 ECM 降解的主要蛋白酶, 参与 ECM 中聚集蛋白聚糖的切割, 并在 IDD 的病理发展过程中增加。有研究表明 suramin 通过下调 ECM 破坏蛋白, 如 ADAMTS-4、ADAMTS-5、MMP-3 和 MMP-13, 以及聚集蛋白聚糖的上调来缓解椎间盘退化[12]。过表达 circPKNOX1 可增加胶原 II、聚集蛋白聚糖和 SOX9 的表达, 降低 ADAMTS4、ADAMTS-5、MMP-3 和 MMP-13 的表达, circPKNOX1 通过 miR-370-3p 调节 KIAA0355 的表达, 从而影响 IVDD 的进展[13]。

补肾壮筋汤最早记载于清代钱秀昌所著的《伤科补要》中, 主要传承《医宗金鉴·正骨心法要旨》的精粹, 方中熟地、山茱萸补益肝肾, 牛膝、杜仲、续断起强壮筋骨的作用, 当归、白芍、青皮能够起活血止痛的作用, 五加皮、茯苓可以利水消肿, 本方具有补肝肾、强筋骨的作用。研究表明, 补肾壮筋汤抑制膝关节炎软骨退变[14][15]。补肾壮筋汤介导内质网应激延缓毒胡萝卜素诱导大鼠椎间盘软骨细胞的退变[16]。

本研究采用动物模型研究椎间盘退变干预机制, 在此基础上, 结合本团队研究中我们对椎间盘组织学和生物化学指标的验证[17], 已证明该模型的严谨性, 现进一步通过组织学检测(如免疫组织化学染色)

和生物化学检测(如 MMP-13、Col2A1、Aggrecan 等蛋白的定量分析)等多维度的验证,我们确定了模型中 MMP-13 的高表达及其对椎间盘退变的促进作用,并验证了补肾壮筋汤在抑制基质降解方面的干预效果,这些结果不仅支持了模型的构建,还为后续药物干预的优化提供了重要依据。

本研究结果显示, MMP-13 在模型组中表达升高,提示 MMPs 的高表达促进了椎间盘退变的进程,进一步验证了模型的成功,随着补肾壮筋汤药物干预剂量的增加,其表达降低。而 Col2A1、Aggrecan 在模型组中表达降低,随着药物浓度使用增加而增加,提示补肾壮筋汤能有效抑制基质的降解,延缓椎间盘退变。考虑补肾壮筋汤可能通过抑制特定炎症因子(如 IL-1 β 、IL-6 等)表达,反馈性抑制多种 miRNA 表达,进而对多种(包括 Aggrecan、Col2A1 和 MMP-13 等)细胞内外基质成分进行调控,延缓椎间盘退化进程[18]。

5. 结论

综上所述,补肾壮筋汤通过降低组织中 MMP-13 的含量,升高 Col2A1、Aggrecan 的含量,重塑细胞外基质,从而延缓软骨退变,在患者的临床应用中,这种干预可能通过减少疼痛和功能受限,从而显著提高生活质量。未来研究可进一步深入探讨补肾壮筋汤作用的分子机制,开发靶向抑制 MMP-13 的配体,以及评估其在不同患者群体中的疗效潜力,同时探索其联合治疗效果。此外,结合影像学和功能评估指标的研究将有助于更全面地验证其临床价值。

基金项目

福建省自然科学基金项目(2022J01345)。

参考文献

- [1] Chou, R. (2021) Low Back Pain. *Annals of Internal Medicine*, **174**, ITC113-ITC128. <https://doi.org/10.7326/aitc202108170>
- [2] Sharma, S. and McAuley, J.H. (2022) Low Back Pain in Low- and Middle-Income Countries, Part 1: The Problem. *Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy*, **52**, 233-235. <https://doi.org/10.2519/jospt.2022.11145>
- [3] Zhu, J., Sun, R., Sun, K., Yan, C., Jiang, J., Kong, F., et al. (2023) The Deubiquitinase USP11 Ameliorates Intervertebral Disc Degeneration by Regulating Oxidative Stress-Induced Ferroptosis via Deubiquitinating and Stabilizing Sirt3. *Redox Biology*, **62**, Article ID: 102707. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2023.102707>
- [4] McHugh, J. (2020) Targeting IL-1 β Expression in IVDD. *Nature Reviews Rheumatology*, **16**, 188-188. <https://doi.org/10.1038/s41584-020-0403-7>
- [5] Wang, Y., Cheng, H., Wang, T., Zhang, K., Zhang, Y. and Kang, X. (2023) Oxidative Stress in Intervertebral Disc Degeneration: Molecular Mechanisms, Pathogenesis and Treatment. *Cell Proliferation*, **56**, e13448. <https://doi.org/10.1111/cpr.13448>
- [6] Kamali, A., Ziadlou, R., Lang, G., Pfannkuche, J., Cui, S., Li, Z., et al. (2021) Small Molecule-Based Treatment Approaches for Intervertebral Disc Degeneration: Current Options and Future Directions. *Theranostics*, **11**, 27-47. <https://doi.org/10.7150/thno.48987>
- [7] Liang, H., Luo, R., Li, G., Zhang, W., Song, Y. and Yang, C. (2022) The Proteolysis of ECM in Intervertebral Disc Degeneration. *International Journal of Molecular Sciences*, **23**, Article No. 1715. <https://doi.org/10.3390/ijms23031715>
- [8] Xin, J., Wang, Y., Zheng, Z., Wang, S., Na, S. and Zhang, S. (2022) Treatment of Intervertebral Disc Degeneration. *Orthopaedic Surgery*, **14**, 1271-1280. <https://doi.org/10.1111/os.13254>
- [9] Zhang, B., Xu, H., Wang, J., Liu, B. and Sun, G. (2017) A Narrative Review of Non-Operative Treatment, Especially Traditional Chinese Medicine Therapy, for Lumbar Intervertebral Disc Herniation. *BioScience Trends*, **11**, 406-417. <https://doi.org/10.5582/bst.2017.01199>
- [10] 李满意, 张子扬, 娄玉铃. 腰痹的源流及相关历史文献复习(下) [J]. 风湿病与关节炎, 2016, 5(6): 51-59.
- [11] Grant, M., Epure, L., Bokhari, R., Roughley, P., Antoniou, J. and Mwale, F. (2016) Human Cartilaginous Endplate Degeneration Is Induced by Calcium and the Extracellular Calcium-Sensing Receptor in the Intervertebral Disc. *European Cells and Materials*, **32**, 137-151. <https://doi.org/10.22203/ecm.v032a09>

-
- [12] Liu, Z., Lu, C., Shen, P., Chou, S., Shih, C., Chen, J., *et al.* (2021) Suramin Attenuates Intervertebral Disc Degeneration by Inhibiting NF- κ B Signalling Pathway. *Bone & Joint Research*, **10**, 498-513. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.108.bjr-2020-0041.r3>
- [13] Huang, Y., Gao, J., Wang, J., Ye, H., Yao, T., Xu, Y., *et al.* (2021) Inhibition of Intervertebral Disc Disease Progression via the circP-KNOX1-miR-370-3p-KIAA0355 Axis. *Cell Death Discovery*, **7**, Article No. 39. <https://doi.org/10.1038/s41420-021-00420-4>
- [14] 许云腾, 陈达, 谭雪, 等. 补肾壮筋汤抑制膝关节关节炎软骨退变机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 4178-4181.
- [15] 黄艳峰, 马德尊, 付长龙, 等. 基于 SDF-1/CXCR4 轴探讨补肾壮筋汤促进小鼠 BMSCs 归巢和保护关节软骨的机制研究[J]. 康复学报, 2024, 34(1): 44-54.
- [16] 梅阳阳, 林伟. 补肾壮筋汤介导内质网应激延缓毒胡萝卜素诱导大鼠椎间盘软骨细胞的退变[J]. 风湿病与关节炎, 2020, 9(5): 1-5+9.
- [17] Zhang, J., Liu, R., Mo, L., Liu, C. and Jiang, J. (2022) Mir-4478 Accelerates Nucleus Pulposus Cells Apoptosis Induced by Oxidative Stress by Targeting MTH1. *Spine*, **48**, E54-E69. <https://doi.org/10.1097/brs.0000000000004486>
- [18] 张加芳. MiR-4478 靶向调节 MTH1 促进氧化应激诱导的髓核细胞凋亡的实验研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 南方医科大学, 2022.