

本文引用: 蒋浩波, 段嘉豪, 刘恩旭, 陈茜, 李夏, 邵乐, 杨少锋, 张晓. 基于网络药理学和实验验证研究加味独活寄生合剂治疗腰椎间盘突出症的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(11): 2081-2091.

基于网络药理学和实验验证研究加味独活寄生合剂治疗 腰椎间盘突出症的作用机制

蒋浩波^{1,2}, 段嘉豪^{1,2}, 刘恩旭^{1,2}, 陈茜³, 李夏¹, 邵乐², 杨少锋^{2*}, 张晓^{2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南长沙 410007;

3. 广东医科大学公共卫生学院, 广东东莞 523808

[摘要] **目的** 通过网络药理学预测加味独活寄生合剂治疗腰椎间盘突出症(lumbar disc herniation, LDH)的相关机制,并通过体外实验验证。**方法** 应用TCMSP、BATMAN-TCM数据库检索加味独活寄生合剂组成药物的活性成分以及潜在靶点。通过GeneCards、OMIM数据库搜集LDH相关的疾病靶点,构建“药物-化合物-疾病靶标”网络模型,获取加味独活寄生合剂干预LDH的交集靶标。运用STRING数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络获取核心靶点。使用R语言软件及Perl语言进行GO分析与KEGG通路分析获得可能的关键通路。提取原代终板软骨细胞,进行细胞形态学观察以及Ⅱ型胶原蛋白(Collagen II)免疫荧光染色鉴定。将体外培养的第3代终板软骨细胞随机分成5组:空白对照组、模型对照组、加味独活寄生合剂低剂量组、加味独活寄生合剂中剂量组、加味独活寄生合剂高剂量组。其中后4组使用添加含有10 ng/mL的白细胞介素17(interleukin-17, IL-17)的DMEM培养基对细胞进行诱导退变造模。流式细胞技术检测各组细胞周期;ELISA检测各组细胞IL-6的含量;实时荧光定量PCR检测p-p65、MMP9 mRNA的表达;Western blot法检测p-p65、MMP9蛋白表达情况。**结果** 网络药理学结果显示,根据ADME标准共筛选加味独活寄生汤19种药物共计295种活性成分,与LDH的疾病靶标相匹配得到交集靶标50个。通过PPI提取得到IL-6成为核心靶标可能性最大,GO分析和KEGG通路分析得到IL-17相关信号途径的富集因子较高。体外实验结果:相比于空白对照组,其他各组细胞生长情况明显受到抑制($P<0.05$);相比于模型对照组,加味独活寄生合剂各组生长情况明显受到促进($P<0.05$)。相比于空白对照组,模型对照组及加味独活寄生合剂各组IL-6、p-p65、MMP9表达显著升高($P<0.05$);相比于模型对照组,加味独活寄生合剂各组IL-6、p-p65、MMP9表达显著降低($P<0.05$)。**结论** 加味独活寄生合剂通过多靶点、多通路抑制炎症反应和细胞凋亡,可能通过调控IL-17/NF- κ B,促进终板软骨细胞的增殖,抑制IL-6以及MMP9的表达,从而发挥对LDH的治疗作用。

[关键词] 加味独活寄生合剂;网络药理学;腰椎间盘突出;终板软骨细胞;作用机制;炎症反应;细胞凋亡

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.11.022

Mechanism of action of Jiawei Duhuo Jisheng Mixture in treating lumbar disc herniation based on network pharmacology and experimental verification

JIANG Haobo^{1,2}, DUAN Jiahao^{1,2}, LIU Enxu^{1,2}, CHEN Xi³, LI Xia¹, SHAO Le²,
YANG Shaofeng^{2*}, ZHANG Xiao^{2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Hospital of Hunan University of

[收稿日期] 2023-04-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82174402);湖南中医药大学校级开放基金(2021XJJ043);湖南中医药大学研究生创新课题(2022CX152);湖南省自然科学基金项目(2023JJ60345;2023JJ60342);湖南省教育厅科学研究项目(21C0233);湖南省卫健委科研计划项目(202204074858)。

[第一作者] 蒋浩波,男,硕士研究生,研究方向:脊椎脊髓及老年慢性筋骨疾病的研究。

[通信作者] * 张晓,男,硕士研究生,医师,E-mail:191304232@qq.com;杨少锋,男,教授,主任医师,博士研究生导师,E-mail:574996585@qq.com。

Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. School of Public Health, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong 523808, China

[Abstract] Objective To predict the related mechanism of Jiawei Duhuo Jisheng Mixture (JWDHJSM) in treating lumbar disc herniation (LDH) by network pharmacology and to verify it by in vitro experiments. **Methods** TC MSP and BATMAN-TCM were used to search for the active ingredients and potential targets of drugs in JWDHJSM. Through the GeneCards and OMIM databases, the LDH-related disease targets were collected, and the “drug-compound-disease target” network model was constructed to obtain the intersection targets of JWDHJSM in the intervention of LDH. The STRING database was utilized to build a protein-protein interaction (PPI) network to obtain core targets. Gene ontology (GO) analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis were performed using R language software and Perl language to obtain potential key pathways. Primary endplate chondrocytes were extracted for cell morphology observation and identified by type II collagen immunofluorescence staining. The third generation of endplate chondrocytes cultured in vitro were randomized into five groups: blank control, model control, and low-, medium-, and high-dose JWDHJSM groups. The cells in the latter four groups were induced for degeneration modeling by DMEM medium containing 10 ng/mL interleukin-17 (IL-17). The cell cycle of each group was determined by flow cytometry, and the content of IL-6 in cells of each group was measured by ELISA. In addition, the mRNA expressions of p-p65 and MMP9 were checked by real-time fluorescence quantitative PCR, and the protein expressions of p-p65 and MMP9 were examined by Western blot. **Results** Network pharmacology showed that a total of 295 active ingredients of 19 drugs in JWDHJSM were screened according to the ADME criteria, and 50 intersection targets were obtained by matching with the disease targets of LDH. IL-6 was most likely to be the core target by PPI extraction. Besides, GO analysis and KEGG pathway analysis revealed a higher enrichment factor of IL-17-related signaling pathways. In vitro experiments indicated that compared with the blank control group, the growth of cells in other groups was significantly inhibited ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the growth of cells in JWDHJSM groups was significantly higher ($P < 0.05$). Compared with the blank control group, the expressions of IL-6, p-p65, and MMP9 of the model control group and JWDHJSM groups significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the model control group, the expressions of IL-6, p-p65, and MMP9 in JWDHJSM groups significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** JWDHJSM inhibits inflammatory response and cell apoptosis through multiple targets and pathways. It may exert its therapeutic effects on LDH by regulating IL-17/NF- κ B, promoting the proliferation of endplate chondrocytes, and suppressing the expressions of IL-6 and MMP9.

[Keywords] Jiawei Duhuo Jisheng Mixture; network pharmacology; lumbar disc herniation; endplate chondrocyte; mechanism of action; inflammatory response; cell apoptosis

近几十年来,腰痛已成为影响人们生活质量最为重要的筋骨疾患之一^[1]。相关研究表明,高达 84% 的人在其一生中都可能受到腰痛的困扰^[2]。其中,腰椎间盘突出症(lumbar disc herniation, LDH)是导致腰痛最为常见的原因之一^[3],它的发生与腰椎退行性改变密切相关。LDH 指椎间盘发生退行性改变后,由于纤维环部分或全部破裂,单独或连同髓核、软骨终板向外突出,刺激或压迫脊髓、神经和血管等组织,引起以腰腿痛为主要症状的病变。椎间盘主要由上下终板软骨(endplate cartilage, EPC)、纤维环(annulus fibrosus, AF)、纤维环包裹的髓核(nucleus pulposus, NP)组成。由于椎间盘内无血管分布,其营养主要依靠终板软骨的扩散。随着人年龄的增长,终板软骨细胞发生退变,终板软骨的营养供给功能障碍,导致椎间盘衰老变性,进而引起 LDH^[4-5]。

LDH 归属于中医学“痹病”范畴,相关研究表明中医在 LDH 的保守治疗中疗效显著^[6]。腰为肾之府,肾主骨,生髓,为先天根本;肝为藏血之脏,在体合筋;当肝肾亏虚时,则精血生发较少,无法滋骨络髓,无法荣筋,而发腰痹,所以肝肾亏虚为 LDH 的主要内因。因此,以独活寄生汤为代表的经典方剂,在治疗 LDH 方面得到了广泛应用^[7-8]。加味独活寄生合剂是在独活寄生汤的基础上,经临床辨证论治、三因制宜对药味、药量进行加减的院内制剂,其对于痹病(风寒湿痹、肝肾不足)有着良好的临床疗效,在保守治疗的情况下,加味独活寄生合剂治疗 LDH 有效率达到了 80%^[9]。

因中药复方成分的复杂性和靶点的不确定性,常规药理研究方法难以全面阐明加味独活寄生合剂治疗 LDH 的分子作用机制。网络药理学作为药理

学新兴分支学科,在揭示化学成分复杂的中药复方的药理学规律上具有独特的优势,其整体性、系统性与中医药的整体观、辨证论等基本理论趋于一致^[10-11]。因此,本研究设计通过网络药理学技术获取加味独活寄生合剂干预 LDH 交集靶标,得到交集靶标以及富集通路,并预测相关机制;最后通过大鼠椎间盘软骨终板细胞的体外实验进行验证,为深入探讨加味独活寄生合剂干预 LDH 的机制提供可靠的理论依据。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

健康 1 月龄 SPF 级 SD 大鼠 20 只,雄性,质量(200±20) g;由湖南中医药大学动物实验中心代购。质量合格证编号为:ZS-202209200008。对于动物的实验操作均经过湖南中医药大学伦理委员会审核,伦理号为:LLBH-202209050004。大鼠 4 只用于原代终板软骨细胞的提取;8 只用于加味独活寄生合剂含药血清的提取,8 只用于无药血清的提取。

1.2 实验用药

加味独活寄生合剂,批号:2022111,湘药制备字:Z20190063,规格:每瓶 250 mL。主要成分:独活、桑寄生、天南星、黄芩、木瓜、威灵仙、杜仲、牛膝、细辛、秦艽、茯苓、肉桂、防风、川芎、人参、甘草、当归、白芍、熟地黄。生药浓度为 0.664 g/mL。

1.3 主要试剂及仪器

CCK-8 细胞活力检测试剂盒(批号:PN659)购自武汉伊莱瑞特生物科技有限公司;PBS 缓冲液(批号:PB180327)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;IL-6 ELISA 试剂盒(批号:Y17039786)购自武汉华美生物工程有限公司;重组人 IL-17(批号:Q16552)购自美国 PeproTech 公司;DAPI(批号:C1005)购自上海碧云天生物技术有限公司;Collagen II 抗体(种属:兔)(批号:ab34712)购自英国 Abcam 公司;Trizol 试剂(批号:5301100)购自美国 Thermo 公司;mRNA 逆转录试剂盒(批号:E047-01B)购自中国北京康为世纪;p-p65 抗体(批号:3033S)、MMP9 抗体(批号:2270S);GAPDH 抗体(批号:2118S)以上抗体均购自美国 CST 公司。

A00-1-1102 型流式仪(Beckman 公司);PW-812 型全自动酶标洗板机(深圳市汇松科技发展有限公司);MB-530 型多功能酶标分析仪(深圳市汇

松科技发展有限公司);PIKOREAL96 型荧光定量 RCP 仪(美国 Thermo 公司);DYY-2C 型电泳仪、DYCP-31DN 型水平琼脂糖电泳槽(中国北京六一公司);GL-88B 型旋涡混合器(中国江苏其林贝尔公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

2.1.1 获取交集靶标 应用 TCMSP 数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)及 BATMAN-TCM 数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)检索加味独活寄生合剂所有组成药物的活性成分。筛选出类药性(drug-likeness, DL)≥0.18、口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%的化合物作为研究对象,然后基于该数据库,将纳入的活性成分逐一配对潜在作用靶点。再通过 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)进行靶点蛋白和基因信息注释,限定物种为“Homo sapiens”,得到加味独活寄生合剂主要活性成分的预测靶点。通过 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<https://omim.org/>)搜集 LDH 相关的疾病靶点,并将化合物作用靶点与疾病靶点取交集,获取加味独活寄生合剂干预 LDH 的交集靶标。

2.1.2 构建“药物-化合物-疾病靶标”网络模型 将交集靶标入 Cytoscape 3.7.0 软件中构建“药物-化合物-疾病靶标”网络图以备后续分析。其中节点的类型代表药物成分、疾病和交集靶标,利用 CentiScape 插件计算有效成分的度值,度值越高提示发挥主要功能的概率越大。

2.1.3 构建 PPI 网络获取核心靶蛋白 将获得的交集靶标输入 STRING(<https://string-db.org/>)数据库,将蛋白种类设置为“Homo sapiens”,将 Settings 设为“high confidence:0.7”,其他参数保持默认设置,获得 PPI 网络。并导入 Cytoscape 3.7.0 绘制蛋白质间相互作用网络并进行网络拓扑分析,根据度值大于中位数筛选出核心靶蛋白。

2.1.4 GO 分析及 KEGG 通路富集分析获取关键通路 用 R 语言(<https://www.r-project.org/>)软件中 clusterProfiler GO.R 插件及 Perl 语言对活性成分与 LDH 的交集靶标进行 GO 分析。并应用 clusterProfiler KEGG.R 插件进行 KEGG Pathway 通路富集分析。根据富集因子值分析核心通路富集程度,探究加

味独活寄生合剂治疗 LDH 的可能的生物功能及信号通路机制。

2.2 体外实验验证

2.2.1 终板软骨细胞的提取、培养和鉴定 取健康 1 月龄 SD 大鼠 4 只,使用 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,脊柱脱臼法处死,使用 75%乙醇浸泡 5 min,移至超净工作台。俯卧固定大鼠,剪开被毛,暴露完整椎体,取出椎间盘终板软骨组织。将组织用无菌 PBS 清洗 3 次,剪碎至 1 mm³ 大小,加入 5 mL 0.2% II 型胶原酶消化液,37 ℃ 恒温摇床,震荡消化 2~3 h。吹打组织 30 次,经过 200 目细胞筛过滤,滤液 1 000 r/min 离心 5 min,离心半径 9 cm。去除上清液后,用含 10%胎牛血清以及 1%双抗(青霉素/链霉素)的 DMEM 培养液将收集的终板软骨细胞重悬,并接种在 25T 的培养瓶内,放置在恒温培养箱(37 ℃、5% CO₂)中培育。24 h 后观察细胞贴壁情况,若贴壁情况良好,则 3 d 后对细胞进行第一次换液,之后每隔 2~3 d 换一次液。当第三代细胞增长至 80%后取出细胞,通过细胞形态学观察以及 Collagen II 免疫荧光染色进行鉴定,鉴定成功后,取出第三代终板软骨细胞进行后续实验。

2.2.2 加味独活寄生合剂药液的制备 采取蒸馏法,浓缩药液至 2 g/mL。

2.2.3 含药血清的制备 1 月龄 SD 大鼠 16 只,适应性喂养 7 d,按随机数表法分为加味独活寄生合剂组和生理盐水组。按照药理试验中动物与人体间的等效剂量换算^[12]。加味独活寄生合剂参考人体剂量(1.186 g·kg⁻¹·d⁻¹),并按人(70 kg)和大鼠(200 g)体表面积折算等效剂量,大鼠等效剂量约为 7.35 g·kg⁻¹·d⁻¹。据相关研究表明,当大鼠灌胃剂量达到临床等效剂量 5 倍时取得的大鼠含药血清质量最高^[13],因此,大鼠需要药物剂量为 36.75 g·kg⁻¹·d⁻¹。浓缩后的药液需要灌 18.375 mL·kg⁻¹·d⁻¹,生理盐水组灌等量的生理盐水,分早晚两次灌胃。灌胃第 7 天给药 1 h 后,使用 3%的戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉采血,常温静置 3 h;以 3 000 r/min、离心半径 9 cm、4 ℃ 条件下离心 15 min,按组收集血清。将各组血清组内混合,减少个体差异。于 56 ℃ 的恒温水浴锅中放置 30 min 灭活,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,保存在 1.5 mL 离心管内,做好标记,放置 -80 ℃ 冰箱保存备用。

2.2.4 造模方法 使用添加含有 10 ng/mL 的 IL-

17 的 DMEM 培养液对第 3 代终板软骨细胞进行培养,经过 24 h 诱导后形成终板软骨细胞退变模型^[14]。通过倒置显微镜、甲苯胺蓝染色以及 Collagen II 免疫荧光染色鉴定细胞并观察细胞退变情况。

2.2.5 含药血清毒性检测 终板软骨细胞以 5×10³ 个/cm³ 的密度接种到 96 孔板中,分别加入 200 μL 含有 0%、5%、10%、20%、40%、60%、80%、100% 含药血清的基础培养基干预 24 h。干预后,将含 10% CCK-8 的 100 μL 基础培养基加入孔板,37 ℃ 孵育 2 h。使用酶标仪检测波长在 450 nm 处测量每个孔的吸光度值(optical density, OD)值。检测细胞活性,分析含药血清毒性。CCK-8 实验计算细胞活力,细胞活力(%)=[(实验孔-空白孔)/(对照孔-空白孔)]×100%。

2.2.6 分组及干预 取 P3 代终板软骨细胞,按随机数字表法随机分成 5 组:空白对照组、模型对照组、加味独活寄生合剂低剂量组(简称低剂量组)、加味独活寄生合剂低剂量组中剂量组(简称中剂量组)、加味独活寄生合剂高剂量组(简称高剂量组)。除空白对照组外,其他 4 组均采用 IL-17 干预大鼠的椎间盘终板软骨细胞。IL-17 干预细胞后使用不同浓度含药及空白血清干预各组细胞。

各组具体干预方式为:空白对照组:20%空白血清+DMEM;模型对照组:20%空白血清+DMEM+10 ng/mL IL-17;低剂量组:5%含药血清+15%空白血清+DMEM+10 ng/mL IL-17;中剂量组:10%含药血清+10%空白血清+DMEM +10 ng/mL IL-17;高剂量组:20%含药血清+DMEM+10 ng/mL IL-17。

2.2.7 各组终板软骨细胞的细胞活性检测 为了测定各组细胞增殖活性情况,将终板软骨细胞以 5×10³ 个/cm³ 的密度接种到 96 孔板中。完成上游干预后,将含 10% CCK-8 的 100 μL 基础培养基加入孔板,37 ℃ 孵育 2 h。使用酶标仪检测波长在 450 nm 处测量每个孔的 OD 值,计算细胞活力。

2.2.8 各组终板软骨细胞的细胞周期情况检测 胰酶消化收集各组细胞,PBS 冲洗 3 遍,1 000 r/min,离心半径 9 cm,3 min 收集细胞沉淀。加入 1 mL 70%的预冷的乙醇固定细胞 24 h;重悬离心 2 遍去除乙醇后,加入 200 μL 碘化丙啶(PI)工作液,4 ℃ 避光染色 30 min。转至流式检测管,上机检测,PI 用 488 nm 氩离子激光器激发,由 630 nm 通滤光片接收,通过 FSC/SSC 散点图收集 10 000 个细胞,

采用设门技术,排除粘连细胞和碎片,分析PI荧光直方图上各细胞周期的百分率。

2.2.9 ELISA 检测各组细胞 IL-6 的表达 收集各组干预完成后的细胞上清液,分别设标准孔和待测样本孔,操作步骤按照试剂盒说明进行。用酶标仪在 450 nm 波长依序测量各孔的光密度 OD 值。以标准品的浓度为纵坐标,OD 值为横坐标,使用 Curve Expert 软件进行分析,计算出样本浓度。

2.2.10 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞 p-p65、MMP9 的基因表达 应用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA。按照试剂操作盒说明书进行逆转录反应得到 cDNA,作为扩增模板,扩增条件如下:95 ℃,10 min;95 ℃,15 s,60 ℃,30 s,40 个循环,熔解曲线分析:60 ℃-95 ℃。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目标 mRNA 的相对表达量,上下游引物由北京擎科生物科技有限公司合成;引物序列:p-p65:正向 5'-CCGATGCATC-CACAGTTCCC-3',反向 5'-TGGGGGCACGGTTATCAAAA-3',长度:156 bp。MMP9:正向 5'-AGGGC-CCCTTCTTATTGCC-3',反向 5'-CACATTTTGC-CCAGAGAA-3',长度:112 bp。GAPDH:正向 5'-TC-ACTATGAGGTCTACTCGG-3',反向 5'-CATATTGCC-AGTTCTTCGTA-3',长度:141 bp。

2.2.11 Western blot 法检测各组 p-p65、MMP9 的表达 各组细胞干预 24 h 后弃上清,PBS 洗涤后加入细胞裂解液和苯甲基磺酰氟 (PMSF),冰上裂解 30 min 后 12 000 r/min,离心半径 5 cm,离心 15 min,吸取上清并加入缓冲液,100 ℃金属浴 5 min 后放入-80 ℃冻存。选用 8%~12% 的分离胶进行电泳,随后将蛋白转移至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入稀释后的一抗 (1:1000) 放入 4 ℃ 过夜, TBST 清洗 3 次,8 min 后用稀释后的二抗 (1:5000) 孵育 1 h,再次使用 TBST 洗膜后加入 ECL 液上机

显影。内参为 GAPDH,使用 Image J 软件分析 p-p65、MMP9 蛋白的相对表达量。

2.2.12 统计学分析 实验数据均用“ $\bar{x}\pm s$ ”,采用 SPSS 25.0 统计学软件进行分析,满足正态性和方差齐性,用单因素方差分析 (ANOVA),组间两两比较采用 LSD 检验;不满足正态性和方差齐性,采用秩和检验;检验水准取 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 加味独活寄生合剂治疗 LDH 的潜在靶点的确定 通过 TCMSP 数据库及 BATMAN-TCM 数据库检索并经文献补充后,共筛选出加味独活寄生合剂 19 种药物共计 295 种活性成分,见图 1A。通过 TCMSP 数据库获取及 SwissTarget 数据库预测的靶点经 UniProt 数据库规范化处理,得到 257 个活性成分作用靶点,通过 GeneCards、OMIM 数据库共搜集得到 498 个 LDH 疾病靶点,加味独活寄生合剂与 LDH 两者的交集靶标为 50 个,见图 1B。

3.1.2 加味独活寄生合剂干预 LDH 的“药物-化合物-疾病靶标”网络模型的构建 将交集靶标入 Cytoscape 软件中构建“药物-化合物-疾病靶标”网络图,见图 2。其中节点的类型代表药物成分、疾病和交集靶标,利用“CentiScape”插件计算有效成分的度值,度值越高提示发挥主要功能的概率越大。在“药物-化合物-疾病靶标”网络模型中,该网络的度值的中位数为 9,大于该值的活性成分有槲皮素、木犀草素、汉黄芩素、山柰酚,提示它们在加味独活寄生合剂干预 LDH 中发挥主要功能。

3.1.3 加味独活寄生合剂干预 LDH 的 PPI 的构建及核心靶蛋白的获取 将获得的交集靶标输入 STRING 数据库,将蛋白种类设置为“Homo sapiens”,

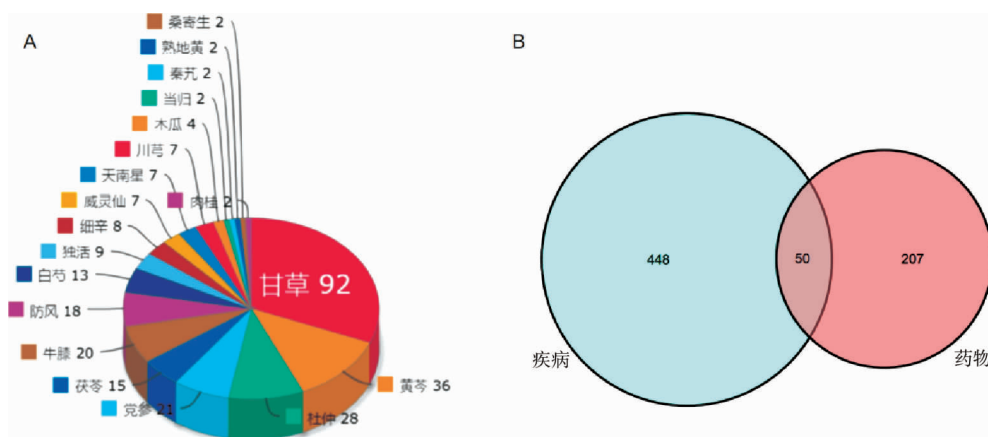


图 1 加味独活寄生汤中有效活性成分分布情况及药物-疾病靶标交集情况

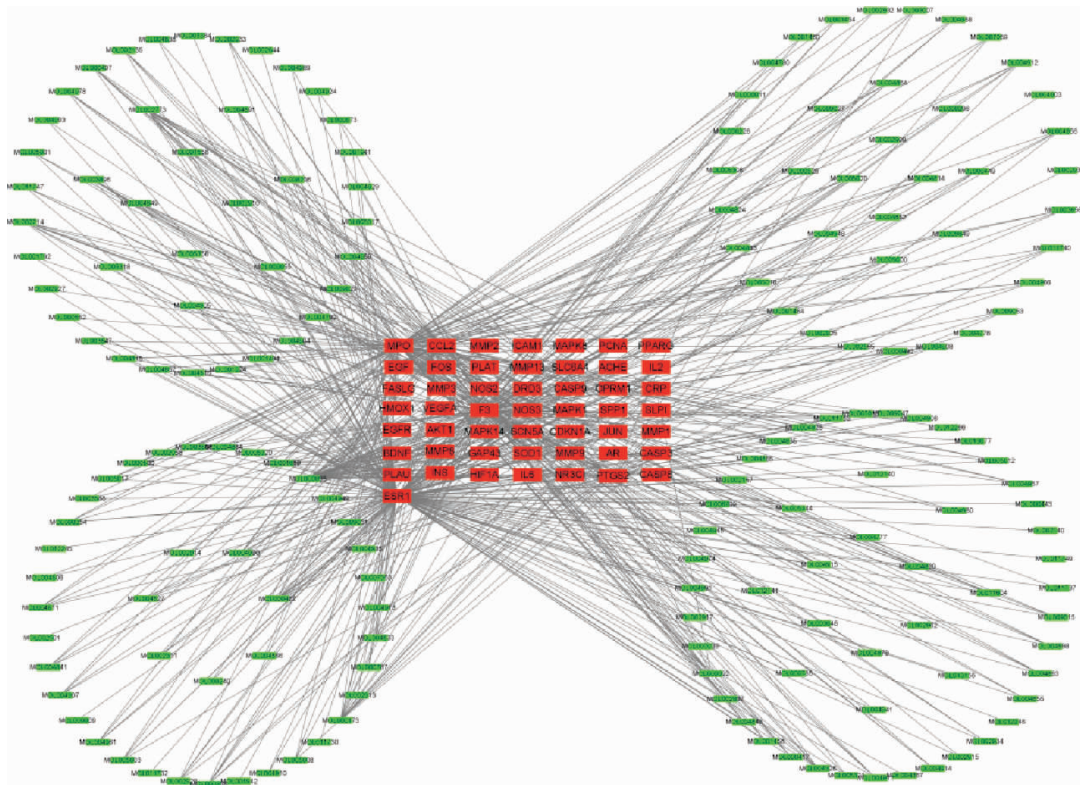


图 2 加味独活寄生合剂干预 LDH 的“药物-化合物-疾病靶标”网络模型

注:图中红色节点代表 LDH 疾病靶基因,绿色节点代表加味独活寄生汤活性成分靶基因。

将 Settings 设为“high confidence:0.7”,其他参数保持默认设置,获得 PPI 网络。并导入 Cytoscape 软件绘制 PPI 网络图并进行网络拓扑分析,根据度值大于中位数筛选出核心靶蛋白,如图 3A 所示。此网络的度值中位数为 13.4,以此为标准筛选出核心靶蛋白 16 个,如图 3B 所示,IL-6 靶蛋白的度值最高,提示最可能是加味独活寄生合剂干预 LDH 的核心靶点。

3.1.4 加味独活寄生合剂活性成分-LDH 靶点 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 通过 clusterProfiler GO.

R 插件及 Perl 语言对活性成分与 LDH 的交集靶标进行 GO 分析获取 1 294 生物功能、22 条细胞功能以及 70 种分子功能,如图 4A 所示。应用 clusterProfilerKEGG.R 插件进行 KEGG 通路富集分析。如图 4B 所示,KEGG 富集分析中 IL-17 相关信号通路富集的集因子值较高,提示其可能为关键通路。

3.2 体外实验验证

3.2.1 终板软骨细胞及其退变模型鉴定 倒置显微镜下细胞贴壁生长,细胞形态为梭形并多角形,见图

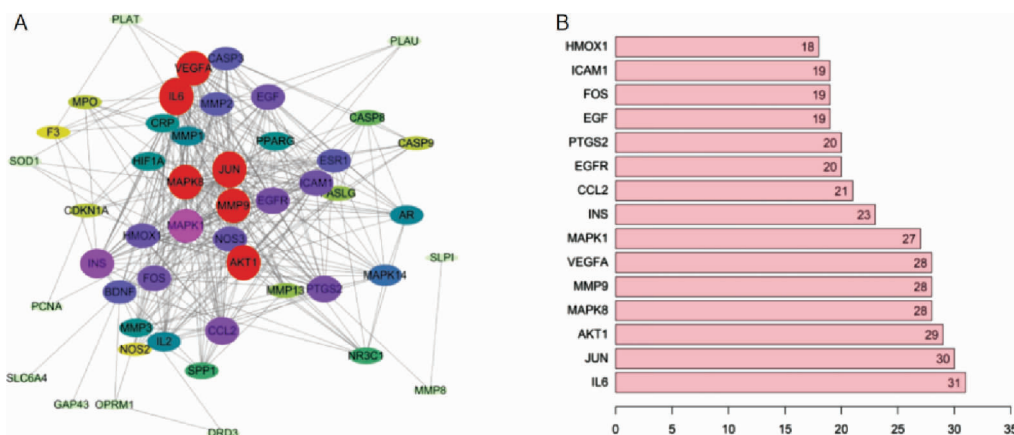


图 3 加味独活寄生合剂干预 LDH 的 PPI 网络图及核心靶蛋白

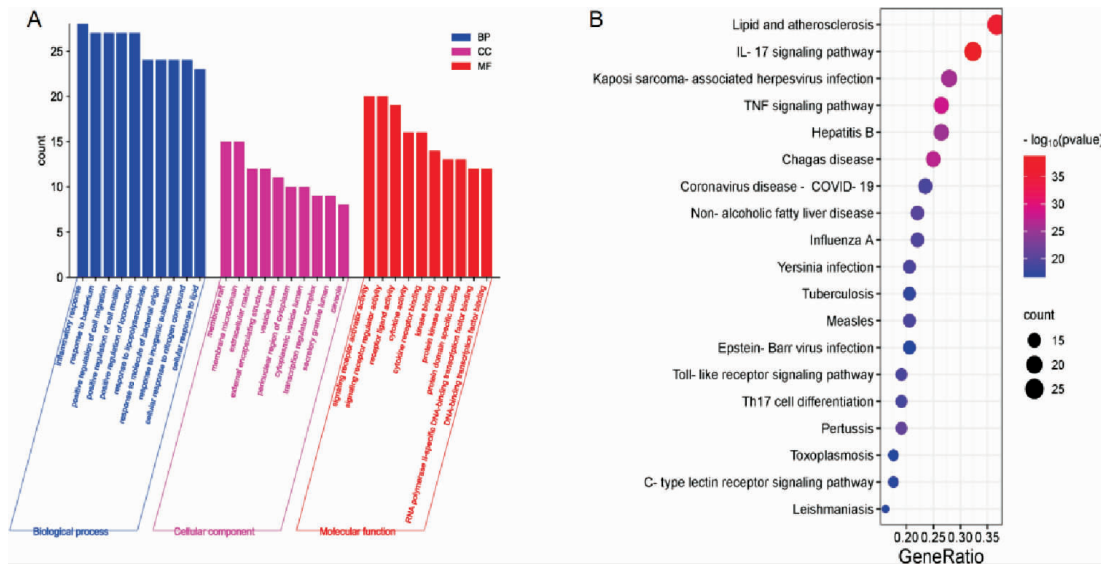


图 4 加味独活寄生合剂干预 LDH 的 GO 功能(A)及 KEGG 通路富集(B)分析

5A。甲苯胺蓝染色显示,细胞核被染色为蓝色,细胞质及胞浆被染为淡蓝色,见图 5B。Collagen II 免疫荧光染色鉴定结果显示,胞浆荧光为红色,细胞核不着色,见图 5C。据此可鉴定提取培养的细胞为终板软骨细胞。

IL-17 刺激诱导终板软骨细胞 24 h 后,倒置显微镜下观察细胞,发现少量漂浮细胞,细胞伪足轻度减少,见图 6A。甲苯胺蓝显示,可见细胞有空泡状改

变,见图 6B。Collagen II 免疫荧光染色鉴定结果显示,红色荧光颜色明显变浅,见图 6C。由此可以推断,经过 IL-17 刺激诱导终板软骨细胞 24 h 后,终板软骨细胞明显退变衰老,细胞功能下降。

3.2.2 含药血清毒性检测 与空白对照组相比,含药血清超过 20% 的各组细胞活性显著下降 ($P < 0.05$),具有显著的细胞毒性,因此,选定最高含药血清浓度为 20%。详见图 7。

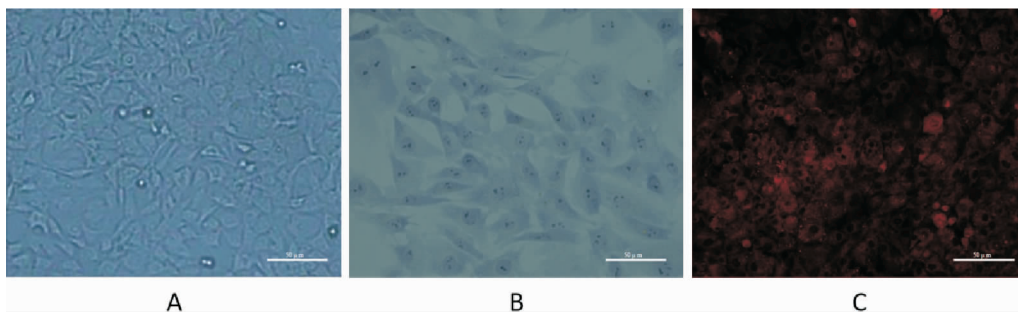


图 5 终板软骨细胞的鉴定

注:A.倒置显微镜下细胞形态;B.甲苯胺染色;C. Collagen II 免疫荧光染色。

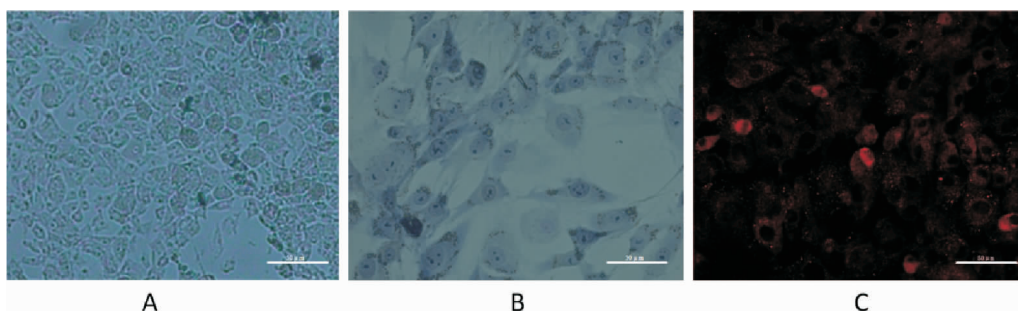


图 6 退变终板软骨细胞模型的鉴定

注:A.倒置显微镜下细胞形态;B.甲苯胺染色;C. Collagen II 免疫荧光染色。

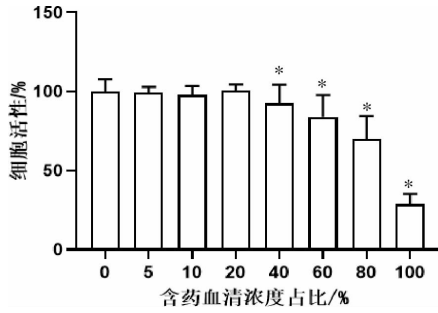


图 7 不同浓度含药血清对终板软骨细胞活性影响
注:与 0%含药血清相比,* $P<0.05$ 。

3.2.3 各组终板软骨细胞活性 与空白对照组相比,经过 IL-17 干预造模 24 h 的终板软骨细胞,活性显著下降($P<0.05$)。与模型对照组相比,加味独活寄生合剂低、中、高剂量组活性显著升高($P<0.05$)。详见图 8。

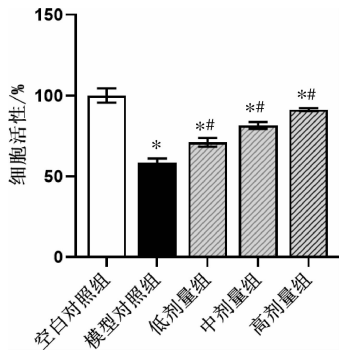


图 8 各组终板软骨细胞活性
注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型对照组相比,** $P<0.05$ 。

3.2.4 各组终板软骨细胞周期 与空白对照组相比,其余各组的 G1 期细胞比例显著升高($P<0.05$),S 期比例显著降低($P<0.05$),见图 9。与模型组相比,加味独活寄生合剂低、中、高剂量组 G1 细胞比例均显著降低($P<0.05$),S 期比例显著升高($P<0.05$),见图 10。

3.2.5 各组终板软骨细胞上清液 IL-6 的含量的比较 与空白对照组相比,经过 IL-17 干预造模 24 h 的终板软骨细胞,IL-6 含量明显升高($P<0.05$)。与模型对照组相比,加味独活寄生合剂低、中、高剂量组 IL-6 含量显著降低($P<0.05$)。详见图 11。

3.2.6 各组终板软骨细胞 p-p65、MMP9 mRNA 的相对表达量 与空白对照组相比,经过 IL-17 干预造模 24 h 的终板软骨细胞,p-p65、MMP9 mRNA 的相对表达量明显升高($P<0.05$)。与模型对照组相比,加味独活寄生合剂低、中、高剂量组 p-p65 mRNA 的相对表达量均显著降低($P<0.05$)。详见图 12。

3.2.7 各组终板软骨细胞 p-p65、MMP9 蛋白的表达 与空白对照组相比,模型对照组 p-p65、MMP9 蛋白表达明显升高($P<0.05$)。与模型对照组相比,加味独活寄生合剂低、中、高剂量组 p-p65、MMP9 蛋白表达均降低($P<0.05$)。详见表 1、图 13—14。

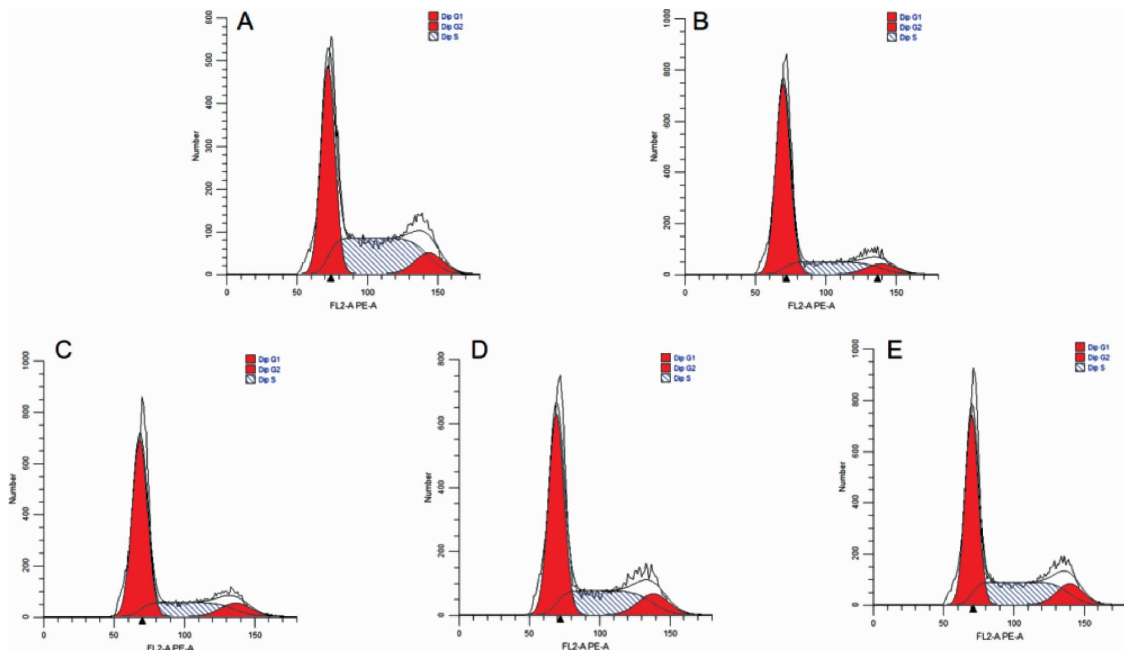


图 9 各组终板软骨细胞周期

注:A.空白对照组;B.模型对照组;C.加味独活寄生合剂低剂量组;D.加味独活寄生合剂中剂量组;E.加味独活寄生合剂高剂量组。

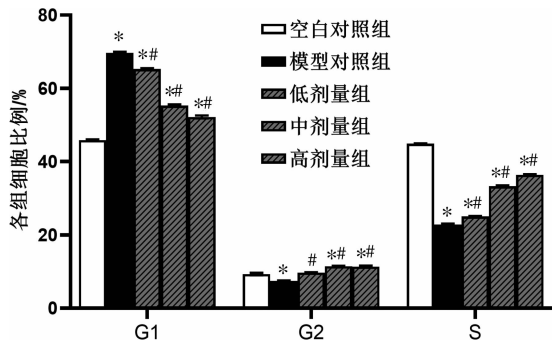


图 10 各组终板软骨细胞周期比例

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型对照组相比,# $P<0.05$ 。

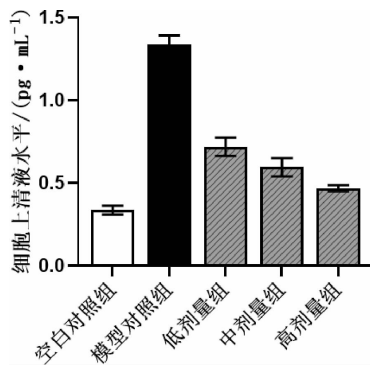


图 11 各组终板软骨细胞上清液 IL-6 的含量

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型对照组相比,# $P<0.05$ 。

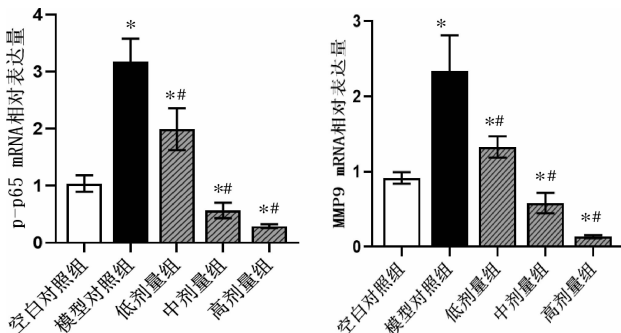


图 12 各组终板软骨细胞 p-p65、MMP9mRNA 的相对表达量

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型对照组相比,# $P<0.05$ 。

表 1 各组软骨细胞中 p-p65、MMP9 蛋白表达量的变化($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	p-p65/GAPDH	MMP9/GAPDH
空白对照组	0.49±0.02	0.71±0.02
模型对照组	0.90±0.02*	0.92±0.01*
加味独活寄生合剂低剂量组	0.79±0.02*#	0.88±0.02*#
加味独活寄生合剂中剂量组	0.76±0.02*#	0.83±0.02*#
加味独活寄生合剂高剂量组	0.58±0.07*#	0.61±0.04*#
F	73.133	76.406
P	<0.05	<0.05

注:与空白对照组相比,* $P<0.05$;与模型对照组相比,# $P<0.05$ 。

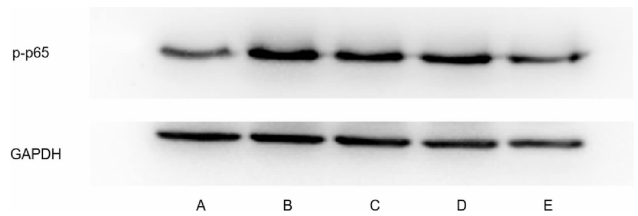


图 13 各组终板软骨细胞 p-p65 蛋白表达电泳图

注:A.空白对照组;B.模型对照组;C.低剂量组;D.中剂量组;E.高剂量组。

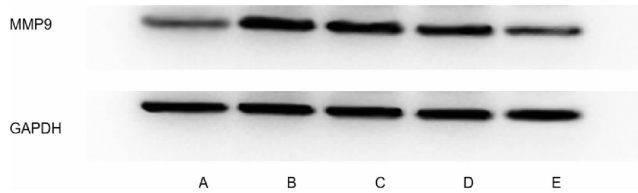


图 14 各组终板软骨细胞 MMP9 蛋白表达电泳图

注:A.空白对照组;B.模型对照组;C.低剂量组;D.中剂量组;E.高剂量组。

4 讨论

随着社会人口老龄化和人们生活方式的改变,LDH 的发病率明显增加^[15]。由于其高致残率的特点,LDH 给社会和家庭带来了沉重的负担^[16-17],因此,对于 LDH 的防治有十分重要的意义。本研究旨在通过网络药理学和体外实验研究,探究加味独活寄生合剂治疗 LDH 的具体作用机制。本研究运用网络药理学方法发现加味独活寄生合剂治疗 LDH 具有多成分、多靶点、多通路的特征。槲皮素、木犀草素、汉黄芩素和山柰酚可能是加味独活寄生合剂治疗 LDH 的主要活性成分,而 IL-6、JUN、AKT-1、MAPK-8 和 MMP9 则是其对应的关键靶点。

研究结果提示,加味独活寄生合剂中含有 295 种活性成分,其中槲皮素、木犀草素、汉黄芩素和山柰酚是治疗 LDH 较为重要的活性成分。这 4 种成分均属于黄酮类化合物,是植物为抵御外界胁迫而产生的天然化合物,具有较强的抗氧化、抗炎和抗病毒作用^[18]。槲皮素是一种在安全剂量范围内天然无毒的类黄酮,具有抗氧化、抗凋亡和抗炎特性,可以通过抑制氧化应激、减少炎症反应和恢复线粒体功能障碍来延缓软骨细胞衰老^[19]。木犀草素抑制 H₂O₂ 诱导原代鼠软骨细胞中的细胞死亡、细胞凋亡、氧化应激、程序性坏死和炎症介质产生^[20]。汉黄芩素通过诱导软骨细胞中 AMPK α 磷酸化,抑制铁死亡,从而保护软骨细胞^[21]。山柰酚可通过抑制炎症、氧化应激、

破骨细胞自噬和成骨细胞凋亡,同时激活成骨细胞自噬来实现骨骼保护作用^[22]。

炎症的刺激会引起终板软骨细胞的退变继而引发椎间盘的突出^[4-5]。IL-17 能够促进炎症因子和趋化因子的表达,导致各种炎症性疾病的发展。IL-17 通过结合异二聚体受体 IL-17RA 和 IL-17RC,可诱导 NF- κ B 等转录基因的表达,增强下游 IL-6、MMP9 等细胞因子的表达^[23-25];从而促进炎症反应的发生,表达一系列炎症介质,这些介质可以损伤软骨细胞功能、抑制软骨细胞增殖并诱导软骨细胞凋亡,最终造成软骨细胞代谢失衡以及疾病的发生和发展^[26]。IL-6 是白细胞介素家族中的一种具有多重效应的细胞因子,参与调控细胞的生长、分化等各方面。作为炎症发生和参与的重要介质,其能够影响 LDH、膝骨性关节炎等骨与关节退行性疾病的发生发展,在腰椎间盘突出组织中存在较高表达^[27]。MMP9 是基质合成和降解的关键调节因子,在生理条件下, MMP9 可水解衰老和受损的椎间盘组织,其过度活化会导致椎间盘的退化并引起疼痛^[28]。此外, NF- κ B 是一种重要的转录因子,可调节软骨细胞增殖和凋亡相关基因的表达^[29]。相关研究表明, IL-17 与软骨细胞表面的 IL-17 受体结合后,可触发 NF- κ B p65 的磷酸化,进而控制软骨正常发育和病理破坏^[30]。

本研究中, IL-17 干预后的细胞伪足轻度减少,有空泡状改变, II 型胶原含量明显减低,形成了明显的终板软骨细胞退变模型。与空白对照组相比,模型对照组细胞活性显著下降 ($P<0.05$),增殖明显被抑制 ($P<0.05$), IL-6、p-p65、MMP9 的表达显著升高 ($P<0.05$)。通过不同浓度的含药血清干预后,相比于模型对照组细胞,细胞活性显著升高 ($P<0.05$),增殖情况显著改善 ($P<0.05$),各组细胞 IL-6、p-p65、MMP9 的表达明显降低 ($P<0.05$)。

综上所述,加味独活寄生合剂含药血清可起到保护终板软骨细胞退变的作用。其可能通过调控 IL-17/NF- κ B 通路,抑制 IL-6 以及 MMP9 的表达,促进终板软骨细胞的增殖,从而发挥对 LDH 的治疗作用。然而,本研究仍存在不足之处,实验只验证了核心通路和对应的核心靶点,实验未设置阳性药物对照组。未能完整验证网络药理学提示的其他通路及蛋白;接下来课题组将进行更加深入的动物实验

和细胞实验,以进一步探究加味独活寄生合剂治疗 LDH 的作用机制,为其临床应用提供更加坚实的理论依据。

参考文献

- [1] Global Burden of Disease Study Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. *Lancet*, 2015, 386(9995): 743–800.
- [2] WALKER B F. The prevalence of low back pain: A systematic review of the literature from 1966 to 1998[J]. *Journal of Spinal Disorders*, 2000, 13(3): 205–217.
- [3] KNEZEVIC N N, CANDIDO K D, VLAEYEN J, et al. Low back pain[J]. *Lancet*, 2021, 398(10294): 78–92.
- [4] SLOAN S R Jr, WIPPLINGER C, KIRNAZ S, et al. Combined nucleus pulposus augmentation and annulus fibrosus repair prevents acute intervertebral disc degeneration after discectomy[J]. *Science Translational Medicine*, 2020, 12(534): eaay2380.
- [5] MADSBU M A, SOLBERG T K, SALVESEN Ø, et al. Surgery for herniated lumbar disk in individuals 65 years of age or older: A multicenter observational study [J]. *JAMA Surgery*, 2017, 152(5): 503–506.
- [6] 李松岩, 王世轩. 腰椎间盘突出症的中医治疗研究进展[J]. *实用中医内科杂志*, 2023, 37(2): 33–35.
- [7] 郝渊源. 独活寄生汤对肝肾亏虚型腰椎间盘突出症的治疗效果及其作用机制研究[J]. *临床医学研究与实践*, 2017, 2(34): 119–120.
- [8] 徐 铭, 姜 宏. 独活寄生汤治疗寒湿痹阻型腰椎间盘突出症的临床疗效及预后观察[J]. *陕西中医*, 2018, 39(2): 157–159.
- [9] 胡 明. 加味独活寄生合剂联合伤速康贴膏治疗腰椎间盘突出症(风寒湿型)临床疗效观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2019.
- [10] SUO T C, LIU J P, CHEN X, et al. Combining chemical profiling and network analysis to investigate the pharmacology of complex prescriptions in traditional Chinese medicine[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40529.
- [11] ZHANG R Z, ZHU X, BAI H, et al. Network pharmacology databases for traditional Chinese medicine: Review and assessment[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 123.
- [12] NAIR A B, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human[J]. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, 2016, 7(2): 27–31.
- [13] LIPINSKI C A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution[J]. *Drug Discovery Today Technologies*, 2004, 1(4): 337–341.

- [14] WANG B L, SUN W, BI K W, et al. Apremilast prevents IL-17-induced cellular senescence in ATDC5 chondrocytes mediated by SIRT1[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2021, 47(3): 12.
- [15] PICAVET H S J, HAZES J M W. Prevalence of self reported musculoskeletal diseases is high[J]. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2003, 62(7): 644-650.
- [16] DEYO R A, MIRZA S K. CLINICAL PRACTICE. herniated lumbar intervertebral disk[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2016, 374(18): 1763-1772.
- [17] SUN K, HUANG F S, QI B Y, et al. A systematic review and meta-analysis for Chinese herbal medicine Duhuo Jisheng Decoction in treatment of lumbar disc herniation: A protocol for a systematic review[J]. *Medicine*, 2020, 99(9): e19310.
- [18] 赵雪巍, 刘培玉, 刘丹, 等. 黄酮类化合物的构效关系研究进展[J]. *中草药*, 2015, 46(21): 3264-3271.
- [19] CUI Z F, ZHAO X T, AMEVOR F K, et al. Therapeutic application of quercetin in aging-related diseases: SIRT1 as a potential mechanism[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 943321.
- [20] ZHOU Z Q, ZHANG L L, LIU Y, et al. Luteolin protects chondrocytes from H₂O₂-induced oxidative injury and attenuates osteoarthritis progression by activating AMPK-Nrf2 signaling[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 5635797.
- [21] WAN Y P, SHEN K, YU H Y, et al. Baicalein limits osteoarthritis development by inhibiting chondrocyte ferroptosis[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2023, 196: 108-120.
- [22] WONG S K, CHIN K Y, IMA-NIRWANA S. The osteoprotective effects of kaempferol: The evidence from in vivo and in vitro studies[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2019, 13: 3497-3514.
- [23] KOENDERS M I, LUBBERTS E, OPPERS-WALGREEN B, et al. Induction of cartilage damage by overexpression of T cell interleukin-17A in experimental arthritis in mice deficient in interleukin-1[J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2005, 52 (3): 975-983.
- [24] BECHARA R, MCGEACHY M J, GAFFEN S L. The metabolism-modulating activity of IL-17 signaling in health and disease[J]. *The Journal of Experimental Medicine*, 2021, 218(5): e20202191.
- [25] LIANG H, YANG X J, LIU C, et al. Effect of NF- κ B signaling pathway on the expression of MIF, TNF- α , IL-6 in the regulation of intervertebral disc degeneration[J]. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 2018, 18(4): 551-556.
- [26] BARNABEI L, LAPLANTINE E, MBONGO W, et al. NF- κ B: At the borders of autoimmunity and inflammation[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 716469.
- [27] PALADA V, AHMED A S, FINN A, et al. Characterization of neuroinflammation and periphery-to-CNS inflammatory cross-talk in patients with disc herniation and degenerative disc disease[J]. *Brain, Behavior, and Immunity*, 2019, 75: 60-71.
- [28] SUN K, JING X Z, GUO J C, et al. Mitophagy in degenerative joint diseases[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2082-2092.
- [29] JIMI E, FEI H, NAKATOMI C. NF- κ B signaling regulates physiological and pathological chondrogenesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(24): 6275.
- [30] MIMPEN J Y, BALDWIN M J, CRIBBS A P, et al. Interleukin-17A causes osteoarthritis-like transcriptional changes in human osteoarthritis-derived chondrocytes and synovial fibroblasts in vitro[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 676173.

(本文编辑 苏维)