

本文引用: 谭婉俊, 吴官保, 彭兴宁, 冯帅华. 补肾活血汤含药血清调控髓核细胞外泌体中 miR-222-3p 抑制髓核细胞凋亡的研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(3): 425-431.

补肾活血汤含药血清调控髓核细胞外泌体中 miR-222-3p 抑制髓核细胞凋亡的研究

谭婉俊¹, 吴官保², 彭兴宁², 冯帅华^{2*}

1. 邵阳市中医医院, 湖南 邵阳 422001; 2. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006

[摘要] **目的** 通过分析补肾活血汤含药血清调控髓核细胞外泌体中的 miR-222-3p 表达, 探索其抑制髓核细胞凋亡的作用。**方法** (1) 将髓核细胞随机分为 PBS 组、空白血清组和含药血清组。空白血清组培养液中加入 10% 普通血清, 含药血清组培养液中加入 10% 补肾活血汤含药血清, PBS 组加入等体积的 PBS。3 组分别培养 48 h 收集标本, 提取外泌体; 透射电镜鉴定外泌体形态结构, Western blot 鉴定外泌体溶酶体相关膜蛋白 3 (CD63)、肿瘤易感基因 101 (TSG101) 蛋白表达, Real-time PCR 检测外泌体 miR-222-3p 的表达。(2) 外泌体共培养肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 诱导髓核细胞模型, 将髓核细胞分为空白组、模型组、空白外泌体组、含药外泌体组、Anti-miR-222-3p 外泌体组; 共培养 24 h 后, 用流式细胞术检测髓核细胞凋亡率, Real-time PCR 检测各组髓核细胞 miR-222-3p 的表达, Western blot 检测各组髓核细胞磷酸化蛋白 53 (p53)、细胞色素 c (Cyt c)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 1 (Caspase-1) 蛋白的表达。**结果** (1) 与空白血清组比较, 含药血清组外泌体数量增多 ($P < 0.05$), 含药血清组外泌体标志蛋白 CD63、Tsg101 相对表达量均增加 ($P < 0.05$), 含药血清组髓核细胞外泌体中 miR-222-3p 表达降低 ($P < 0.05$); (2) 与模型组及空白外泌体组比较, 含药外泌体组及 Anti-miR-222-3p 外泌体组髓核细胞凋亡率进一步降低, 髓核细胞 miR-222-3p 表达减少 ($P < 0.05$), p53、Cyt c、Caspase-1 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$)。**结论** (1) 补肾活血汤含药血清可有效促进大鼠髓核细胞分泌外泌体, 并抑制髓核细胞外泌体中 miR-222-3p 的表达; (2) 补肾活血汤含药外泌体可减轻 TNF- α 诱导的退行性髓核细胞的病理损伤, 并减少髓核细胞凋亡, 其机制可能与抑制 miR-222-3p 及凋亡相关蛋白 p53、Cyt c、Caspase-1 表达密切相关。

[关键词] 补肾活血汤; 髓核细胞; 外泌体; miR-222-3p; 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.2025.03.005

Effects of BuShen Huoxue Decoction-mediated serum on regulating miR-222-3p expression in exosomes and inhabiting nucleus pulposus cell apoptosis

TAN Wanjun¹, WU Guanbao², PENG Xingning², FENG Shuaihua^{2*}

1. Shaoyang Hospital of TCM, Shaoyang, Hunan 422001, China; 2. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China

[Abstract] **Objective** To investigate the inhibitory effects of Bushen Huoxue Decoction-mediated serum on nucleus pulposus cell apoptosis by analyzing its regulation of miR-222-3p expression in exosomes derived from nucleus pulposus cell. **Methods** (1) Nucleus pulposus cells were randomly divided into PBS group, blank serum group, and medicated serum group. The blank serum group was supplemented with 10% normal serum, the medicated serum group with 10% Bushen Huoxue

[收稿日期] 2024-10-25

[基金项目] 湖南省自然科学基金面上项目 (2022JJ30025); 湖南省卫生健康委员会一般课题 (W20243066)。

[通信作者] * 冯帅华, 男, 副主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: 960986431@qq.com。

Decoction-medicated serum, and the PBS group with an equal volume of PBS. After 48 h, samples were collected, and exosomes were extracted. Transmission electron microscopy was used to identify the morphological structure of exosomes. Western blot was used to determine protein expressions of lysosome-associated membrane protein 3 (CD63) and tumor susceptibility gene 101 (TSG101) in exosomes. Real-time PCR was applied to examine the miR-222-3p expression in exosomes. (2) Exosomes were co-cultured with tumor necrosis factor- α (TNF- α) to induce nucleus pulposus cell models. The nucleus pulposus cells were divided into blank group, model group, blank exosome group, medicated exosome group, and Anti-miR-222-3p exosome group. After 24 h of co-culture, the apoptosis rate of nucleus pulposus cells was measured by flow cytometry, the expression of miR-222-3p in nucleus pulposus cells was determined by real-time PCR, and the protein expressions of p53, cytochrome C (Cytc), and cysteine-aspartic acid protease 1 (Caspase-1) were checked by Western blot among different groups. **Results** (1) Compared with the blank serum group, the medicated serum group showed increased number of exosomes ($P<0.05$), elevated relative protein expression levels of exosomal marker proteins CD63 and TSG101 ($P<0.05$), and decreased miR-222-3p expression in exosomes derived from nucleus pulposus cells. (2) Compared with the model group and the blank exosome group, the apoptosis rate of nucleus pulposus cells further decreased, the miR-222-3p expression in nucleus pulposus cells decreased ($P<0.05$), and the relative protein expression levels of p53, Cytc, and Caspase-1 decreased ($P<0.05$) in the medicated exosome group and the Anti-miR-222-3p exosome group. **Conclusion** (1) Bushen Huoxue Decoction-medicated serum can effectively prompt the secretion of exosomes by rat nucleus pulposus cells and inhibit miR-222-3p expression in exosomes derived from these cells. (2) Bushen Huoxue Decoction-medicated exosomes can alleviate the pathological damage of degenerative nucleus pulposus cells induced by TNF- α and reduce nucleus pulposus cell apoptosis. The mechanism may be closely associated with the inhibition of expressions of miR-222-3p as well as apoptosis-related proteins p53, Cytc, and Caspase-1.

[**Keywords**] Bushen Huoxue Decoction; nucleus pulposus cells; exosomes; miR-222-3p; apoptosis

椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)是导致腰背疼痛的主要原因,据了解,80%的成年人都会经历某种形式的腰背疼痛,腰背疼痛已成为医院就诊的常见原因,每年产出巨大的医疗支出^[1]。近年来,寻找 IDD 的有效治疗方法成为研究重点^[2-4]。IDD 期间,椎间盘(intervertebral disc, IVD)经历复杂的生化和细胞变化,包括蛋白聚糖含量的损失、II 型胶原蛋白向 I 型胶原蛋白的转变以及髓核细胞密度的降低^[5]。这些退行性变化直接导致 IVD 机械功能减弱,最终引起结构破坏,例如纤维环撕裂和髓核突出。IVD 的自我修复能力有限,退化过程通常会进展直至不可逆转^[5]。因此,开发针对 IDD 的有效治疗方法已刻不容缓。

MicroRNA(miRNA)是一组单链、非编码、小功能的 RNA^[6],在干细胞(包括软骨终板)成骨分化中具有关键作用^[7-8],miR-222-3p 基因簇位于 X 染色体 p113 位点,对炎症相关性疾病的负性调控作用相对明显。有研究显示,过表达的 miR-222-3p 显著增加了髓核细胞的凋亡,减少了髓核细胞的增殖,miR-222-3p 通过抑制髓核细胞的活性来调节 IDD 的发展^[9]。但是关于中药复方介导 miR-222-3p 调控髓核细胞参与椎间盘退变相关机制的研究还鲜有报

道。本研究团队通过取得大鼠髓核细胞,研究补肾活血汤含药血清对大鼠髓核细胞分泌外泌体及 miR-222-3p 表达以及髓核细胞外泌体结构形态及数量的影响,旨在揭示补肾活血汤通过介入髓核细胞外泌体的细胞机制,丰富补肾活血法的理论内涵,为补肾活血汤防治 IDD 提供新的科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

3 月龄 SD 大鼠,雄性,SPF 级,体质量(300±50) g,由湖南省中医药研究院实验中心提供。实验大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SYXK(湘)2020-0008]。将大鼠分笼饲养于湖南省中医药研究院实验中心(SPF 级),饲养温度为 23~26 ℃,湿度为 50%~60%。日照时间 8:00—18:00,严格按照实验室要求,每 2 d 更换 1 次垫料,厚度 3~5 cm,保持清洁干燥。本课题实验方案已通过院动物实验伦理审查(伦理审批号:ZUFY20230307)。

1.2 实验药物

补肾活血汤制备按照《伤科大成》中补肾活血汤的组成:熟地黄 15 g,杜仲 10 g,枸杞子 10 g,补骨脂 15 g,菟丝子 10 g,当归尾 10 g,没药 10 g,山茱

黄 10 g,肉苁蓉 10 g,独活 10 g,红花 6 g。组方中药材均按《中华人民共和国药典》2020年版所记载,由湖南省中医药研究院附属医院药剂科提供,浸泡,煎煮,去渣,分别浓缩至 0.58 g/mL 的中药溶液(临床等效剂量),封瓶备用。

1.3 主要试剂

环氧树脂包埋套装(北京中镜科仪技术有限公司,批号:18005、18022、18032、18042);环氧丙烷(上海迈瑞尔化学公司,批号:M25514);磷酸盐缓冲液 PBS(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:ZLI-9062);钨酸、戊二醛、胰酶消化液、三抗(青链霉素)(中国 abioWell 公司,批号:AWI0136、AWI0097、AWC0232、AWH0372a);肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)(abcam 公司,批号:ab229366)。

1.4 主要仪器

直热式二氧化碳培养箱(上海三藤仪器有限公司,型号:DH-160I);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司,型号:DSZ2000X);低速离心机(上海知信实验仪器技术有限公司,型号:SL02);烤箱(北京市光明医疗仪器公司,型号:101型);精密 pH 计(中国雷磁公司,型号:E-201-C);切片机(德国莱卡公司,型号:leica UC-7);恒温箱(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C);摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号:TS-92);台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司,型号:H1650R)。

2 方法

2.1 补肾活血汤含药血清的制备

将 12 只 SPF 级大鼠随机分为含药血清组和普通血清组,每组 6 只。根据人体和大鼠体表面积换算公式($x \text{ mg/kg} \times 70 \text{ kg} \times 0.018/0.2 \text{ kg} = 6.3 x \text{ mg/kg}$),计算出大鼠给药剂量,中药血清组按 0.58 g/mL 浓度的补肾活血汤灌胃,普通血清组灌以等量生理盐水。每天 2 次,共 7 d。末次灌胃结束 4 h 后,经用 1%戊巴比妥钠麻醉,经腹主动脉采血,离心 10 min($4 \text{ }^\circ\text{C}$, $2\ 000 \times g$)、过滤、灭活后获得普通血清和含药血清,保存备用。

2.2 髓核细胞的制备与分组

无菌剥离 SD 大鼠 L4/5、L5/6 椎间盘组织,在无菌手术条件下 PBS 液清洗椎间盘组织,切成碎粒,于 0.25%胰蛋白酶中以 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴消化 30 min,离

心 5 min($4\ 000 \text{ r/min}$),去上清,PBS 液清洗。收集髓核细胞,细胞培养在含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基中,置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中。随机分为 PBS 组、空白血清组及含药血清组。空白血清组培养液中加入 10%普通血清,含药血清组培养液中加入含 10% 补肾活血汤含药血清,PBS 组加入等体积的 PBS。

2.3 髓核细胞外泌体的制备

在各组髓核细胞培养 24 h 后,待细胞贴壁后将培养基更换为无外泌体培养基,继续培养至 48 h 后收集上清液,过滤,多次离心取上清液,所得沉淀即为外泌体。用 PBS 缓冲液洗涤沉淀并重悬,于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 低温保存备用。

2.4 髓核细胞外泌体的鉴定

各组髓核细胞进行外泌体提取后,采用透射电镜观察髓核细胞外泌体形态结构,Western blot 检测外泌体标记物溶酶体相关膜蛋白 3(lysosome-associated membrane protein 3,CD63)、肿瘤易感基因 101 蛋白(tumor susceptibility gene 101 protein,TSG101)蛋白的表达,Real-time PCR 检测外泌体 miR-222-3p 的表达。

2.5 TNF- α 刺激髓核细胞与不同组别的髓核细胞外泌体共培养

TNF- α 诱导大鼠髓核细胞退变,使用 10 ng/mL 的 TNF- α 刺激 NPCs 细胞,持续 24 h,镜下观察 NPCs 细胞形态、结构,以明确 TNF- α 诱导的髓核细胞造模成功。使用不同组别的髓核细胞外泌体共培养 24 h 后,电镜下观察各组髓核细胞的形态结构。细胞进行分组干预,空白组:PBS 培养的正常髓核细胞(NPCs+PBS);模型组:PBS 培养 TNF- α 诱导的髓核细胞(NPCs+TNF- α +PBS);空白外泌体组:普通血清外泌体+TNF- α 髓核细胞(NPCs+TNF- α +普通血清-Exo);含药外泌体组:含药血清外泌体+TNF- α 髓核细胞(NPCs+TNF- α +含药血清-Exo);Anti-miR-222-3p 外泌体组:AntagomiR-222-3p 处理后外泌体+TNF- α 髓核细胞(NPCs+TNF- α +Anti-miR-222-3p-Exo)。

2.6 流式细胞术(Annexin V-PI 双染色法)检测外泌体共培养各组髓核细胞凋亡情况

按“2.5 项”下分组,收集各组细胞到 10 mL 的离心管中,每细胞数为 $(1\sim 5) \times 10^6/\text{mL}$, $500\sim 1\ 000 \text{ r/min}$ 离心 5 min,弃去培养液。PBS 洗 1 次,加入 500 μL

的 Binding Buffer 悬浮细胞,加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ L Propidium Iodide,混匀,室温、避光、反应 5~15 min。在 1 h 内,流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

2.7 Real-time PCR 检测外泌体共培养各组髓核细胞 miR-222-3p 的表达

按 TRJzol 试剂说明书分别提取各组的 miR-222-3p。用特异的 TaqMan 反转录探针将 miR-222-3p 反转录成 cDNA,使用 TaqMan MicroRNA 反转录试剂盒配制反转录体系,配制反应体系的所有操作均在冰上进行。反应条件:94 $^{\circ}$ C,4 min;94 $^{\circ}$ C,10 s;60 $^{\circ}$ C,30 s,并检测信号;循环 39 次;实时监测和定量扩增的产物;以 β -actin 为内参,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量比较。

2.8 Western blot 检测外泌体共培养各组髓核细胞肿瘤抗原 p53(cellular tumor antigen p53, p53)、细胞色素 c(cytochrome c, Cytc)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny aspartate specific proteinase 1, Caspase-1)蛋白的表达

取“2.5 项”各组细胞的蛋白和外泌体样本于水浴锅中煮沸变性,各上样 20 μ g,凝胶电泳,PVDF 转膜,5%封闭液封闭处理 1 h 后,加入 p53(1:1 000)、Cytc(1:1 000)、Caspase-1(1:2 000)、GAPDH(1:5 000)一抗于 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜,次日 TBST 清洗后加入二抗(1:5 000),室温条件下孵育 2 h,洗膜,滴加 E-CL 显影,化学发光仪曝光成像,用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.9 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。所有计量资料均采用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较先检验资料的正常性和方差齐性,符合条件者采用 *t* 检验(两组间)或单因素方差分析(多组间),进一步多重比较采用 LSD 法进行;相关性分析采用简单线性回归分析。均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组髓核细胞外泌体结构形态

各组细胞外泌体均呈盘状囊泡,直径为 40~100 nm,进一步分析发现,PBS 组及空白血清组外泌体囊泡较大,含药血清组外泌体囊泡相对较小。详见图 1。

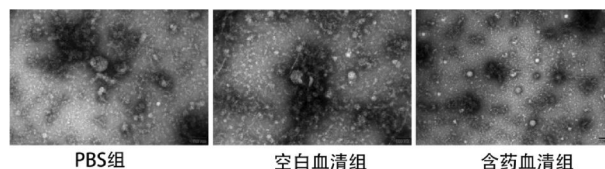


图 1 各组细胞培养液中外泌体的形态结构变化情况(透射电镜,100 nm)

Fig.1 Morphological and structural changes of exosomes in cell culture medium of each group (transmission electron microscopy, 100 nm)

3.2 各组髓核细胞外泌体标志蛋白 CD63、Tsg101 表达情况

与 PBS 组比较,空白血清组外泌体标志蛋白 CD63 相对表达量减少($P<0.05$),Tsg101 蛋白相对表达量增加($P<0.05$);与空白血清组比较,含药血清组外泌体标志蛋白 CD63、Tsg101 相对表达量均增加($P<0.05$)。详见图 2 和表 1。

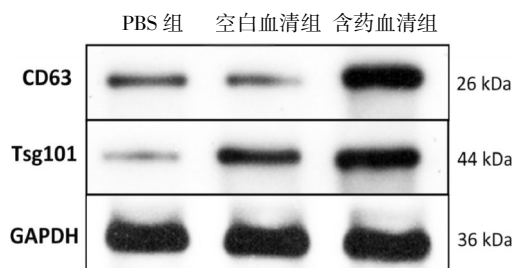


图 2 外泌体标志蛋白 CD63、Tsg101 电泳条带图

Fig.2 Electrophoretic bands of exosomal marker proteins CD63 and TSG101

表 1 各组细胞培养液中外泌体标志蛋白 CD63、Tsg101 相对表达量比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Comparison of relative expression levels of exosome marker proteins CD63 and TSG101 in cell culture medium among different groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	CD63/GAPDH	Tsg101/GAPDH
PBS 组	0.302 \pm 0.019	0.097 \pm 0.035
空白血清组	0.171 \pm 0.037*	0.457 \pm 0.087*
含药血清组	0.824 \pm 0.053**	0.734 \pm 0.036**

注:与 PBS 组比较,* $P<0.05$;与空白血清组比较,** $P<0.05$ 。

3.3 各组髓核细胞外泌体中 miR-222-3p 表达情况

与 PBS 组比较,空白血清组及含药血清组髓核细胞外泌体中 miR-222-3p 表达降低($P<0.05$);与空白血清组比较,含药血清组髓核细胞外泌体中 miR-222-3p 表达降低($P<0.05$)。详见表 2。

表2 各组髓核细胞外泌体中 miR-222-3p 表达比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Comparison of miR-222-3p expression in exosomes derived from nucleus pulposus cells among different groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	miR-222-3p 相对表达量
PBS 组	1.00±0.13
空白血清组	0.85±0.08 [#]
含药血清组	0.34±0.23 ^{*#}

注:与 PBS 组比较,[#] $P<0.05$;与空白血清组比较,^{*} $P<0.05$ 。

3.4 外泌体共培养各组髓核细胞凋亡情况

空白组髓核细胞晚期凋亡率为 2.12%,早期凋亡率为 0.52%,总凋亡率为 2.64%;模型组髓核细胞晚期凋亡率为10.32%,早期凋亡率为 9.34%,总凋亡率为19.66%;空白外泌体组晚期凋亡率为 13.97%,早期凋亡率为 5.58%,总凋亡率为 19.55%;含药外泌体组晚期凋亡率为 5.32%,早期凋亡率为3.20%,总凋亡率为 8.52%;Anti-miR-222-3p 外泌体组晚期凋亡率为 3.08%,早期凋亡率为4.81%,总凋亡率为 7.89%。详见图3。

3.5 外泌体共培养各组髓核细胞 miR-222-3p 表达情况

与空白组比较,模型组及空白外泌体组髓核细

胞 miR-222-3p 表达增加($P<0.05$)。与模型组比较,含药外泌体组及 Anti-miR-222-3p 外泌体组髓核细胞 miR-222-3p 表达减少($P<0.05$)。与 Anti-miR-222-3p 外泌体组比较,含药外泌体组髓核细胞 miR-222-3p 表达增加($P<0.05$)。详见表 3。

表3 各组髓核细胞 miR-222-3p 表达比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Comparison of miR-222-3p expression in nucleus pulposus cells among different groups ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	miR-222-3p 相对表达
空白组	1.00±0.13
模型组	1.58±0.44 [#]
空白外泌体组	1.63±0.32 [#]
含药外泌体组	0.80±0.26 ^{#△}
Anti-miR-222-3p 外泌体组	0.36±0.06 ^{*#}

注:与空白组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$;与 Anti-miR-222-3p 外泌体组比较,[△] $P<0.05$ 。

3.6 各组髓核细胞凋亡相关蛋白 p53、Cytc、Caspase-1 相对表达情况

与空白组比较,模型组及空白外泌体组髓核细胞 p53、Cytc、Caspase-1 蛋白相对表达量上升($P<0.05$);与模型组比较,补肾活血汤含药外泌体组及 Anti-miR-222-3p 外泌体组髓核细胞 p53、Cytc、

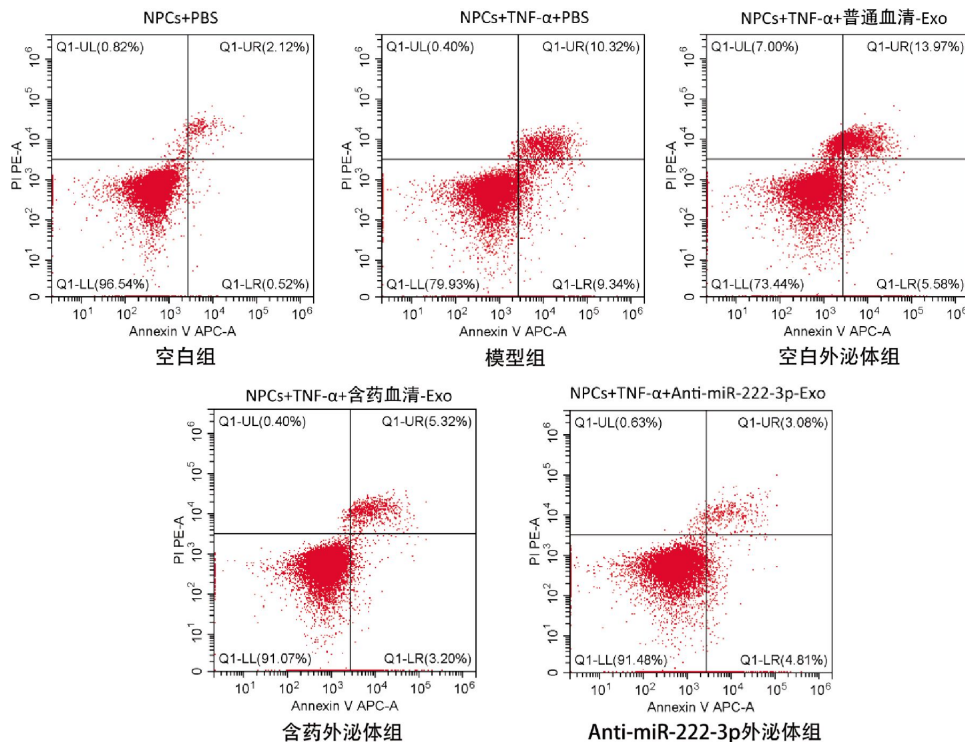


图3 各组髓核细胞凋亡情况

Fig.3 Apoptosis of nucleus pulposus cells in each group

注:UR 为晚期凋亡率;LR 为早期凋亡率;UR+LR 为总凋亡率。

Caspase-1 蛋白相对表达量降低 ($P < 0.05$); 与 Anti-miR-222-3p 外泌体组比较, 补肾活血汤含药外泌体组髓核细胞 CytC 蛋白相对表达量上升 ($P < 0.05$)。详见图 4 和表 4。

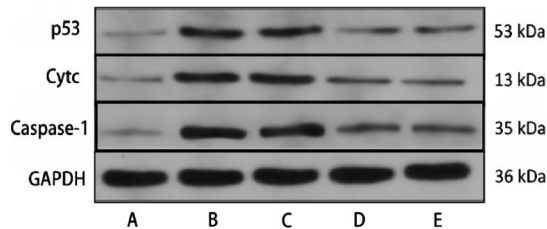


图 4 各组髓核细胞凋亡相关蛋白 p53、CytC、Caspase-1 电泳条带图

Fig.4 Electrophoretic bands of apoptosis-related proteins p53, CytC, and Caspase-1 in nucleus pulposus cells of each group

注: A.空白组; B.模型组; C.空白外泌体组; D.补肾活血汤含药外泌体组; E. Anti-miR-222-3p 外泌体组。

4 讨论

外泌体来源于细胞的纳米囊泡, 参与细胞间的物质运输, 介导细胞间通讯。通过外泌体, 供体细胞可以将治疗药物中的小分子或核酸药物转移到受体细胞, 增加治疗剂的局部浓度并使其不良反应最小化^[10]。外泌体可以协助髓核细胞再生, 抑制细胞凋亡, 进一步帮助维持 IVD 的稳态^[11]。本次研究得出, 补肾活血汤含药血清组较空白血清组外泌体数量明显增多, 但其具体机制还待进一步研究。

CD63、Tsg101 是目前常用的外泌体蛋白标志物^[12]。张伟业等^[13]通过 Western blot 检测外泌体标志蛋白表达, 可见髓核细胞外泌体均有特征性膜蛋白 CD63、Tsg101 表达。本次研究发现, 补肾活血汤含药血清组外泌体标志蛋白 CD63、Tsg101 相对表达量

均显著增加, 与既往研究结果一致, 提示补肾活血汤能促进髓核细胞外泌体标志蛋白的分泌。

外泌体含有功能蛋白质、核酸(mRNA、miRNA、lncRNA 等)和脂质^[14], miRNA 是外泌体中的重要通信物质, 多种 miRNA 包括 miR-21、miR-199、miR-30d、miR-125a 等参与调节髓核细胞的凋亡^[15]。外泌体中的 miRNA 在基因表达调控中发挥重要作用^[16], miR-222-3p 涉及恶性肿瘤^[17]、心血管疾病^[18]等疾病的发展。此次研究结果发现, 补肾活血汤含药外泌体组髓核细胞的 miR-222-3p 表达相较于普通血清外泌体组髓核细胞明显减少, 表明补肾活血汤含药外泌体可有效发挥相应的生物学作用, 减少 TNF- α 诱导的退行性髓核细胞中 miR-222-3p 的表达, 从而减少病理损伤。

频繁的姿势变化、疲劳负荷和久坐会增加椎间盘退变的风险, 随着椎间盘上的负荷升高, 髓核细胞作为椎间盘上重要的组成部分, 能感知并响应机械刺激, 若刺激加重, 髓核细胞形态皱缩, 细胞膜被破坏, 最终导致其衰老^[19]。髓核细胞细胞数量的多少被认为是重建椎间盘功能的关键^[20]。本次研究表明, 补肾活血汤含药外泌体组总凋亡率为 8.52%, 空白组总凋亡率为 2.64%、模型组髓核细胞总凋亡率为 19.66%, 空白外泌体组总凋亡率为 19.55%, 相比较于模型组、空白外泌体组, 补肾活血汤含药外泌体组可明显抑制 TNF- α 诱导的髓核细胞凋亡。在凋亡相关蛋白方面, 补肾活血汤含药外泌体组 p53、CytC、Caspase-1 蛋白相对表达量较空白组、模型组、空白外泌体组明显降低 ($P < 0.05$), 提示通过拮抗外泌体中 miR-222-3p 表达, 可抑制 TNF- α 诱导的髓核细胞凋亡相关蛋白的表达, 而补肾活血汤含药外泌体亦可通过抑制髓核细胞凋亡相关蛋白的表达发挥保护作用。

表 4 各组髓核细胞凋亡相关蛋白 p53、CytC、Caspase-1 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Comparison of relative expression levels of apoptosis-related proteins p53, CytC, and Caspase-1 in nucleus pulposus cells among different groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	p53/GAPDH	CytC/GAPDH	caspase-1/GAPDH
空白组	0.195 \pm 0.013	0.232 \pm 0.015	0.201 \pm 0.027
模型组	0.530 \pm 0.033 [#]	0.648 \pm 0.024 [#]	0.752 \pm 0.045 [#]
空白外泌体组	0.521 \pm 0.025 [#]	0.579 \pm 0.035 [#]	0.679 \pm 0.024 [#]
含药外泌体组	0.278 \pm 0.040 ^{*#}	0.320 \pm 0.011 ^{*#Δ}	0.324 \pm 0.015 ^{*#}
Anti-miR-222-3p 外泌体组	0.291 \pm 0.024 ^{*#}	0.245 \pm 0.022 [*]	0.329 \pm 0.034 ^{*#}

注: 与空白组比较, [#] $P < 0.05$; 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 Anti-miR-222-3p 外泌体组比较, ^{Δ} $P < 0.05$ 。

IVD 归属于中医学“痹病”“腰痛”“腰腿痛”等范畴,基于各代医家的整理和论证,将本病的基本病机总结归纳为筋脉痹阻、腰府失养。内伤多责之禀赋不足,肾亏腰府失养;外感为风、寒、湿、热诸邪痹阻经脉,或劳力扭伤,气滞血瘀,经脉不通而致腰痛^[21]。补肾活血汤为《伤科大成》所记载的经方,方中熟地黄、山茱萸为君药,益肾填精;杜仲、枸杞子、肉苁蓉、补骨脂、菟丝子为臣药,温补元阳,使筋骨坚强;当归尾、没药、红花、独活为佐药,活血通络,祛风除湿。全方以补肾温阳为主,兼以活血祛湿,扶正祛邪,标本兼顾。本课题组在前期实验动物模型研究中证实了补肾活血汤可有效调控 TNF- α 及 p38MAPK 蛋白的表达,抑制经典 Wnt/ β -catenin 信号通路中关键蛋白分子 β -catenin 蛋白的表达,降低 D-半乳糖致 IL-1 β 、TGF- β 1 表达从而起到延缓椎间盘退变的作用^[2-3]。

综上所述,补肾活血汤含药血清可有效促进大鼠髓核细胞分泌外泌体,并抑制髓核细胞外泌体中 miR-222-3p 的表达;补肾活血汤含药外泌体可减轻 TNF- α 诱导的退行性髓核细胞的病理损伤,并减少髓核细胞凋亡,其机制可能与抑制 miR-222-3p 及凋亡相关蛋白 p53、Cyt c、Caspase-1 表达密切相关。

参考文献

- [1] VO N V, HARTMAN R A, PATIL P R, et al. Molecular mechanisms of biological aging in intervertebral discs[J]. *Journal of Orthopaedic Research*, 2016, 34(8): 1289-1306.
- [2] 冯帅华, 刘仁, 吴官保, 等. 补肾活血汤对 D-半乳糖致椎间盘退变大鼠模型 IL-1 β 、TGF- β 1 表达的影响[J]. *中医药导报*, 2018, 24(4): 11-13, 17.
- [3] 冯帅华, 吴官保, 杨屈, 等. 补肾活血汤调节 rabHK-2 外泌体对椎间盘髓核细胞凋亡及 Wnt 信号通路的影响[J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(5): 2-8.
- [4] YANG S F, LI L H, ZHU L G, et al. Bu-Shen-Huo-Xue-Fang modulates nucleus pulposus cell proliferation and extracellular matrix remodeling in intervertebral disk degeneration through miR-483 regulation of Wnt pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(12): 19318-19329.
- [5] SAKAI D, GRAD S. Advancing the cellular and molecular therapy for intervertebral disc disease[J]. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015, 84: 159-171.
- [6] WANG C, WANG W J, YAN Y G, et al. MicroRNAs: New players in intervertebral disc degeneration[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2015, 450: 333-341.
- [7] GAO Y G, PATIL S, QIAN A R. The role of microRNAs in bone metabolism and disease[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(17): 6081.
- [8] JIAO J H, FENG G, WU M F, et al. miR-140-5p promotes osteogenic differentiation of mouse embryonic bone marrow mesenchymal stem cells and post-fracture healing of mice[J]. *Cell Biochemistry and Function*, 2020, 38(8): 1152-1160.
- [9] LIU J W, YU J, JIANG W P, et al. Targeting of CDKN1B by miR-222-3p may contribute to the development of intervertebral disc degeneration[J]. *FEBS Open Bio*, 2019, 9(4): 728-735.
- [10] FAMILTSEVA A, JEREMIC N, TYAGI S C. Exosomes: Cell-created drug delivery systems[J]. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2019, 459(1/2): 1-6.
- [11] BHUJEL B, SHIN H E, CHOI D J, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes and intervertebral disc regeneration: Review[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(13): 7306.
- [12] ILIUK A, WU X F, LI L, et al. Plasma-derived extracellular vesicle phosphoproteomics through chemical affinity purification[J]. *Journal of Proteome Research*, 2020, 19(7): 2563-2574.
- [13] 张伟业, 展嘉文, 朱立国, 等. 循环牵张力作用下髓核外泌体对终板软骨细胞的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2023, 27(2): 223-229.
- [14] RIAU A K, ONG H S, YAM G H F, et al. Sustained delivery system for stem cell-derived exosomes[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 1368.
- [15] 胡宝阳, 杨学军. microRNA 影响椎间盘退变过程的研究进展及可发展空间[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(21): 3372-3378.
- [16] LIANG W S, HAN B, HAI Y, et al. Mechanism of action of mesenchymal stem cell-derived exosomes in the intervertebral disc degeneration treatment and bone repair and regeneration[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, 9: 833840.
- [17] WU J N, CHEN Y Y, LIAO Z H, et al. Self-amplifying loop of NF- κ B and periostin initiated by PIEZO1 accelerates mechano-induced senescence of nucleus pulposus cells and intervertebral disc degeneration[J]. *Molecular Therapy*, 2022, 30(10): 3241-3256.
- [18] GONG L, ZHANG W M, YUAN Y C, et al. miR-222 promotes invasion and migration of ovarian carcinoma by targeting PTEN[J]. *Oncology Letters*, 2018, 16(1): 984-990.
- [19] 张英, 东丽. LncRNA RMRP 靶向调控 miR-613 对乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *河北医药*, 2020, 42(19): 2891-2895.
- [20] DING S G, HUANG H T, XU Y M, et al. miR-222 in cardiovascular diseases: Physiology and pathology[J]. *BioMed Research International*, 2017, 2017: 4962426.
- [21] 白建. 中医药治疗椎间盘退变研究进展[J]. *辽宁中医杂志*, 2021, 48(9): 210-212.