

梁立超,吴春芳,夏玲,等. 基于 IKK β /NF- κ B 通路探究捏脊疗法对颈椎病模型大鼠椎间盘细胞炎症性反应及凋亡的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 33(5): 44-51.

Liang LC, Wu CF, Xia L, et al. Effect of chiropractic therapy on inflammatory response and apoptosis of intervertebral disc cells in rats with cervical spondylosis based on the IKK β /NF- κ B pathway [J]. Chin J Comp Med, 2022, 33(5): 44-51.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.05.006

基于 IKK β /NF- κ B 通路探究捏脊疗法对颈椎病模型大鼠椎间盘细胞炎症性反应及凋亡的作用

梁立超^{1*}, 吴春芳¹, 夏玲¹, 李君²

(1.淄博市中心医院康复医学科, 山东 淄博 255022; 2.滨州医学院附属医院呼吸内科, 山东 滨州 256600)

【摘要】 目的 探讨捏脊疗法对颈椎病模型大鼠椎间盘细胞炎症性反应及凋亡的影响及可能的作用机制。**方法** 随机选择 8 只 SPF 级 SD 大鼠作为假手术组(雌雄各半), 剩余大鼠利用动静力失衡法诱导椎间盘模型, 成模大鼠随机分为模型组、捏脊组及对照组, 每组各 8 只, 其中捏脊组每日进行捏脊疗法, 对照组大鼠每日灌胃美洛昔康片 0.75 mg/kg, 假手术组、模型组大鼠不作治疗处理, 连续 28 d。苏木精-伊红(HE)染色检测椎间盘组织病理学变化; 原位末端标记(TUNEL)染色检测椎间盘细胞凋亡情况; 酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清 TNF- α 、IL-1 β 水平; 免疫组化技术检测椎间盘组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素 1 β (IL-1 β)蛋白表达水平; 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)技术检测 Caspase-3、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl2)及 Bcl2 相关 X 蛋白(Bax)mRNA 相对表达量; 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 Cleaved Caspase-3、Bax、Bcl2、I κ B 激酶 β (IKK β)、p-IKK β 、NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)、p-I κ B α 、核因子- κ Bp65(NF- κ Bp65)及 p-p65 蛋白表达情况。**结果** 与假手术组比模型组、捏脊组及对照组大鼠椎间盘组织结构均见有不同程度的退化, 髓核组织皱缩, 与外部纤维环边界不清, 椎间盘病理组织学评分、内部髓核(NP)细胞凋亡率、血清 TNF- α 、IL-1 β 水平、椎间盘组织中 TNF- α 、IL-1 β 蛋白平均光密度值、Caspase-3、Bax mRNA 相对表达量、Cleaved Caspase-3、Bax、p-IKK β 、p-p65 及 p-I κ B α 蛋白相对表达量升高, 椎间盘组织中 Bcl2 mRNA 及蛋白相对表达量降低($P<0.05$); 与模型组比较, 捏脊组及对照组大鼠椎间盘组织结构退化逐渐减轻, 椎间盘病理组织学评分、NP 细胞凋亡率、血清 TNF- α 、IL-1 β 水平、椎间盘组织中 TNF- α 、IL-1 β 蛋白平均光密度值、Caspase-3、Bax mRNA 相对表达量、Cleaved Caspase-3、Bax、p-IKK β 、p-p65 及 p-I κ B α 蛋白相对表达量降低, 椎间盘组织中 Bcl2 mRNA 及蛋白相对表达量升高($P<0.05$); 捏脊组上述指标及因子变化程度不及对照组($P<0.05$)。**结论** 捏脊疗法可减轻颈椎病大鼠椎间盘细胞炎症性反应及凋亡, 改善椎间盘退变(IDD)进展, 其作用机制可能与抑制 IKK β /NF- κ B 通路有关。

【关键词】 捏脊疗法; 颈椎病模型; 椎间盘细胞; 炎症反性; 凋亡; I κ B 激酶 β /核因子- κ B 通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 05-0044-08

Effect of chiropractic therapy on inflammatory response and apoptosis of intervertebral disc cells in rats with cervical spondylosis based on the IKK β /NF- κ B pathway

LIANG Lichao^{1*}, WU Chunfang¹, XIA Ling¹, LI Jun²

(1. Department of Rehabilitation Medicine, Zibo Central Hospital, Zibo 255022, China.

2. Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256600)

【基金项目】 山东省医药卫生科技发展计划项目(2017WS752)。

【作者简介】 梁立超(1987—), 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 康复医学。E-mail: cunjie1733@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effect of chiropractic therapy on the inflammatory response and apoptosis of intervertebral disc cells in rats with cervical spondylosis and its possible mechanism. **Methods** Overall, 8 SPF SD rats were randomly selected as the sham operation group (half male and female). The remaining rats were used to establish an intervertebral disc model by the dynamic and static imbalance method. Model rats were randomly divided into model, chiropractic, and control groups with eight rats in each group. The chiropractic group was subjected to chiropractic therapy every day, the control group was administered 0.75 mg/kg meloxicam tablets every day, and sham operation and model groups were untreated for 28 days. HE staining was used to detect histopathological changes of the intervertebral disc. TUNEL staining was used to detect apoptosis of intervertebral disc cells. Immunohistochemistry was used to detect tumor necrosis factor (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) protein expression in intervertebral disc tissue. Serum TNF- α and IL-1 β levels were measured by ELISA. RT-qPCR was used to measure relative mRNA expression of Caspase-3, B-cell lymphoma/leukemia-2 gene (Bcl2) and Bcl2-related X protein (Bax). Protein expression of Cleaved Caspase-3, Bax, Bcl2 and I κ B kinase β (IKK β), p-IKK β , NF- κ B inhibitor protein α (I κ B α), p-I κ B α , nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) and p-p65 was detected by Western blot. **Results** Compared with the sham operation group, the model, chiropractic, and control groups showed that the tissue structure of intervertebral disc was in various degrees of degeneration, the nucleus pulposus tissue shrunked, and the boundary with the external fibrous ring was unclear, meanwhile, intervertebral disc histopathological score, nucleus pulposus (NP) cell apoptosis rate, serum TNF- α and IL-1 β , TNF- α and IL-1 β protein expression, Caspase-3 and Bax mRNA expression, and p-IKK β , p-p65 and p-I κ B α protein expression in the intervertebral disc tissue all increased, while the expression of Bcl2 mRNA and protein decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the chiropractic, and control groups showed that degeneration of the intervertebral disc tissue structure was reduced gradually, and the intervertebral disc histopathological score, NP cell apoptosis rate serum TNF- α and IL-1 β , TNF- α and IL-1 β protein expression, caspase-3 and Bax mRNA expression, and p-IKK β , p-p65 and p-I κ B α protein expression in the intervertebral disc tissue were decreased, while Bcl2 mRNA and protein expression were increased in intervertebral disc tissue ($P < 0.05$). Changes in the above indexes and factors in the chiropractic group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Chiropractic therapy reduces the inflammatory reaction and apoptosis of intervertebral disc cells in rats with cervical spondylosis and improves the progression of intervertebral disc degeneration. The mechanism may be related to inhibition of the IKK β /NF- κ B pathway.

[Keywords] chiropractic therapy; cervical spondylosis model; intervertebral disc cells; inflammatory reaction; apoptosis; I κ B kinase β /nuclear factor- κ B pathway

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

颈椎病是现代社会常见的脊柱退行性疾病,临床表现出明显的姿势控制受损和主观平衡障碍^[1]。中医骨科理论认为,脊柱退行性疾病的基本病理在于颈椎动静系统失衡,基于此开发了捏脊疗法,经长期临床验证后发现该法可有效治疗颈椎病^[2]。现代医学认为,颈椎病常由椎间盘退变(intervertebral disc degeneration, IDD)引起,IDD 病因复杂,其中椎间盘炎性反应可减少健康细胞外基质产生并诱导内部髓核(nucleus pulposus, NP)细胞凋亡,与 IDD 进展密不可分^[3],因此抑制炎症反应可能是治疗颈椎病的关键靶点。研究发现,I κ B 激酶 β /核因子- κ B (I κ B kinase β / nuclear factor κ B, IKK β /NF- κ B)通路参与调节细胞凋亡和炎症反应^[4],但关于捏脊疗法是否可通过 IKK β /NF- κ B 通路减轻颈椎间盘炎症及细胞凋亡进而改善颈椎病的相关报道较少,故本研究拟通过诱导颈椎病大鼠

模型,给予捏脊治疗,以期为捏脊疗法的干预机理和相关疾病的治疗提供一定的参考资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,6 周龄,体重 (180 ± 20) g,由河南省实验动物中心提供[SCXK(豫)2017-0001]。饲养于齐鲁医药学院动物房[SYXK(鲁)2021-0010],饲养条件为恒温(24 ± 2) $^{\circ}$ C、恒湿(相对湿度 50%~60%)环境,给予充足洁净饮水和普通饲料,12 h 光照/12 h 黑暗交替,适应性培养 1 周。研究方案经齐鲁医药学院实验动物伦理委员会批准(IACUC20190814C),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

美洛昔康片(7.5 mg,国药准字 H20061231)购

自苏州威尔森药业有限公司; TNF- α (ab220210)、IL-1 β (ab9722)、Cleaved Caspase-3 (ab49822)、Bcl2 相关 X 蛋白 (Bcl2 associated X protein, Bax) (ab53154) 及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma / leukemia-2, Bcl2) (ab196495) 抗体购自美国 Abcam 公司; NF- κ Bp65 (AN365)、IKK β (A1137)、p-IKK β (A1139) 和 NF- κ B 抑制蛋白 α (NF- κ B inhibitor protein α , I κ B α) (A1096) 抗体购自上海碧云天; p-I κ B α (K21377)、p-NF- κ Bp65 (K21416) 抗体购自北京百奥莱博生物科技有限公司; 大鼠肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) (K1052) ELISA 试剂盒、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) (K4796) ELISA 试剂盒购自武汉艾美捷科技有限公司; MultiskanTM FC 多功能酶标仪购自美国赛默飞世尔科技有限公司; ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 系统购自美国 ABI 公司; Gel Doc XR+凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 造模、分组及干预

颈椎病模型建立^[5]: 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射诱导麻醉, 俯卧位固定, 颈部备皮并于颈背部正中位置作切口, 横向一次切断颈部后侧肌肉, 完全切除颈髂肋肌及头半棘肌, 最后切除大鼠 C2~C7 椎间盘上的棘上和棘间韧带, 缝合皮肤, 假手术组仅切开皮肤和皮下组织, 不切断肌肉即进行皮肤缝合, 术后 3 d 内均进行抗菌抗炎给药。饲养 2 个月后, 经颈椎 X 线检查见椎间孔变小, 椎间隙变窄, 同时颈椎生理弯曲消失甚至反曲即为成功造模, 成模期间, 死亡 4 只大鼠 (雌鼠 1 只, 雄鼠 3 只), 3 只大鼠造模失败 (雌鼠 2 只, 雄鼠 1 只), 随机弃去 1 只雌鼠, 剩余成模大鼠随机分为模型组、捏脊组及对照组, 每组各 8 只 (雌雄各半), 另随机选择 8 只大鼠 (4 只雌鼠, 4 只雄鼠) 作为假手术组。捏脊组大鼠, 参考文献^[6]进行捏脊治疗: 固定大鼠至腹部紧贴固定板, 一手辅助固定, 一手食指和拇指对捏尾根部脊柱中线两侧皮肤并提起, 交替捻动向前提至“大椎穴”, 8~14 遍时捏三提一从尾根部至大椎穴, 每天 1 次, 同时灌胃与对照组等量生理盐水; 假手术组及模型组大鼠每日等量灌胃生理盐水并同捏脊组大鼠固定, 对照组大鼠灌胃美洛昔康片 0.75 mg/(kg·d), 另同捏脊组大鼠固定。治疗时间连续 28 d。

1.3.2 标本采集与处理

40 mg/kg 戊巴比妥钠腹腔注射诱导麻醉, 心脏

取血, 3500 r/min, 4℃ 离心 15 min, 取上清用于 ELISA 检测; 进行枕骨后断头处理, 取 C2~C7 椎间盘组织, 清洗多余血迹后部分于 4% 多聚甲醛中固定, 分别用于 HE 染色及免疫组化检测; 另一部分保存于液氮中以用于 RT-qPCR 及 Western blot 检测。

1.3.3 HE 染色观察病理组织学变化

椎间盘组织经 4% 多聚甲醛固定 48 h, 10% EDTA 脱钙液 (含 EDTA 100 g/L、NaOH 12 g/L、PBS 12.5 g/L) 脱钙 5 d, 脱钙程度以针轻刺无阻力为标准。常规石蜡包埋制备 5 μ m 中矢状区域石蜡切片并行 HE 染色, 参考 ThomPson 椎间盘退变病理分级对椎间盘退变程度进行病理学评分^[7]。

1.3.4 TUNEL 染色检测椎间盘 NP 细胞凋亡情况

5 μ m 中矢状区域石蜡切片行常规 TUNEL 染色, 见细胞质或细胞核中有棕色颗粒即呈染色阳性, 细胞凋亡指数 = (染色阳性细胞数/总细胞数) $\times$ 100%。

1.3.5 ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-1 β 水平

根据说明书, 严格按照操作步骤测定各组大鼠血清中 TNF- α 、IL-1 β 在 450 nm 处的吸光度值, 利用标准曲线计算 TNF- α 、IL-1 β 血清浓度。

1.3.6 免疫组化技术检测椎间盘组织 TNF- α 、IL-1 β 蛋白表达

5 μ m 中矢状区域石蜡切片脱蜡后, 0.125% 胰蛋白酶 37℃ 处理 30 min 进行抗原修复, 3% 双氧水室温孵育 20 min 以消除内源性过氧化物酶活性, 20% 山羊血清封闭非特异性蛋白结合位点 20 min, 后将切片与 TNF- α 一抗 (1: 200)、IL-1 β 一抗 (1: 200) 4℃ 孵育过夜, 二抗 37℃ 孵育 1 h。镜下观察, 见棕色颗粒即为染色阳性, 阳性相对面积利用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析。

1.3.7 RT-qPCR 技术检测 Caspase-3、Bax 及 Bcl2 mRNA 相对表达量

TRIzol 法提取各组大鼠椎间盘组织总 RNA, 测定 RNA 纯度及浓度, RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit 逆转录为 cDNA, 制备 RT-qPCR 反应体系, 于实时荧光定量 PCR 仪内进行定量检测。反应条件为 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。以假手术组作为对照, 以 GAPDH 为内参基因, 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法量化 mRNA 表达水平。引物序列如下: Caspase 3: F: 5'-GTTTGAGCCTGAGCAGAGACAT-3', R: 5'-GGCAGCATCATCCACACATACC-3'; Bax: F: 5'-TGCTTCAGGGTTTCATCCA-3', R: 5'-

GACACTCGCTCAGCTTCTTG-3’; Bcl2: F: 5’-GAT AACGGAGGCTGGGTAGG-3’, R: 5’-CCAGAGGAGG AGGTAGGGAC-3’; β -actin: F: 5’-GAGCTATGAG CTGCCTGACG-3’, R: 5’-AGCACTTGCGGTCCACGA TG-3’。

1.3.8 Western blot 技术检测椎间盘组织中相关蛋白表达情况

取各组大鼠椎间盘组织碾碎, RIPA 裂解液裂解, 高速离心取上清, 测定蛋白浓度后, 统一蛋白浓度并加热变性; 等量蛋白经 SDS-PAGE 分离, 后转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 4℃ 一抗孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次, ECL 显影, 凝胶成像系统拍照, Image J 软件分析目的条带灰度值, 目的蛋白灰度值/内参 β -actin 灰度值表示蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对所收集数据进行统计学分析, 计量结果均以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间样本比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 椎间盘组织病理学变化

HE 染色结果显示, 假手术组大鼠椎间盘组织 NP 完整, 与纤维环界限清晰, 未见退行性改变; 与

假手术组比较, 模型组大鼠椎间盘组织表现为典型退变特征, NP 组织皱缩, 与外部纤维环边界模糊; 捏脊组及对照组大鼠椎间盘组织退化特征见有不同程度缓解, NP 组织形态、NP 细胞结构及密度逐渐改善。见图 1、表 1。

2.2 大鼠椎间盘 NP 细胞凋亡情况

与假手术组比较, 其它 3 组大鼠椎间盘 NP 细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 捏脊组和对照组大鼠椎间盘 NP 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$); 与捏脊组比较, 对照组大鼠椎间盘 NP 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$)。见图 2、表 2。

2.3 大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平

与假手术组比较, 其它 3 组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 捏脊组和对照组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 水平降低 ($P < 0.05$)。见图 3、表 3。

表 1 大鼠椎间盘组织病理学评分比较 (n=8)

Table 1 Comparison of histopathological score of intervertebral disc in rats

组别 Groups	病理学评分 Pathological score
假手术组 Sham operation group	1.25 $\pm$ 0.46
模型组 Model group	4.38 $\pm$ 0.52 *
捏脊组 Chiropractic group	2.88 $\pm$ 0.64 * #
对照组 Control group	2.13 $\pm$ 0.64 * #※

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与捏脊组比较, ※ $P < 0.05$ 。

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$. Compare with model group, # $P < 0.05$. Compared with chiropractic group, ※ $P < 0.05$.

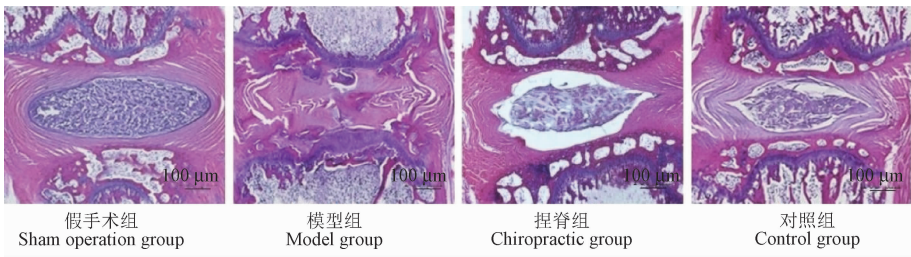


图 1 大鼠椎间盘 HE 染色

Figure 1 HE staining of rat intervertebral disc

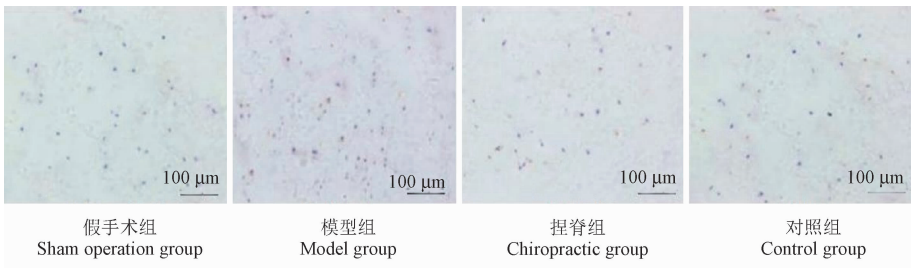


图 2 大鼠椎间盘 NP 组织 TUNEL 染色

Figure 2 TUNEL staining of NP tissue in rat intervertebral disc

表 2 大鼠椎间盘 NP 细胞凋亡率比较 (n=8)

Table 2 Comparison of apoptosis rate of NP cells in rat intervertebral disc

组别 Groups	NP 细胞凋亡率 Apoptosis rate of NP cells
假手术组 Sham operation group	1.55±0.52
模型组 Model group	14.53±1.98 [*]
捏脊组 Chiropractic group	6.28±0.88 ^{*#}
对照组 Control group	5.25±0.65 ^{*##}

注:与假手术组比较, ^{*} *P*<0.05;与模型组比较, [#] *P*<0.05;与捏脊组比较, ^{*} *P*<0.05。

Note. Compared with sham operation group, ^{*} *P*<0.05. Compare with model group, [#] *P*<0.05. Compared with chiropractic group, ^{*} *P*<0.05.

表 3 大鼠血清 TNF-α、IL-1β 水平比较 (n=8, pg/mL)

Table 3 Comparison of serum TNF-α and IL-1β levels in rats

组别 Groups	TNF-α	IL-1β
假手术组 Sham operation group	33.87±3.76	172.06±8.99
模型组 Model group	64.79±4.54 [*]	405.85±25.18 [*]
捏脊组 Chiropractic group	43.44±2.83 ^{*#}	225.76±15.16 ^{*#}
对照组 Control group	38.91±3.25 ^{*##}	198.78±12.75 ^{*##}

注:与假手术组比较, ^{*} *P*<0.05;与模型组比较, [#] *P*<0.05;与捏脊组比较, ^{*} *P*<0.05。

Note. Compared with sham operation group, ^{*} *P*<0.05. Compare with model group, [#] *P*<0.05. Compared with chiropractic group, ^{*} *P*<0.05.

0.05);与捏脊组比较,对照组大鼠血清 TNF-α、IL-1β 水平降低 (*P*<0.05)。见表 3。

2.4 椎间盘组织中 TNF-α、IL-1β 蛋白表达情况

与假手术组比较,其它 3 组大鼠椎间盘组织中 TNF-α、IL-1β 蛋白平均光密度值升高 (*P*<0.05);与模型组比较,捏脊组和对照组大鼠椎间盘组织中 TNF-α、IL-1β 蛋白平均光密度值降低 (*P*<0.05);与捏脊组比较,对照组大鼠椎间盘组织中 TNF-α、IL-1β 蛋白平均光密度值降低 (*P*<0.05)。见图 3、表 4。

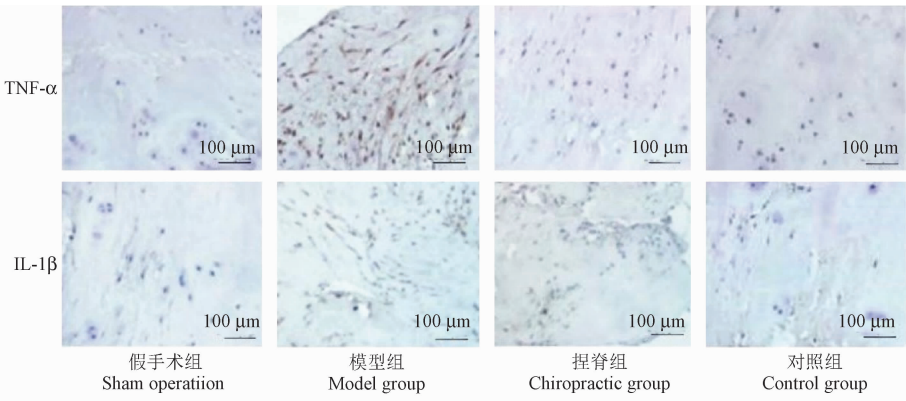


图 3 大鼠椎间盘组织 TNF-α、IL-1β 蛋白免疫组化染色

Figure 3 Immunohistochemical staining of TNF-α and IL-1β proteins in rat intervertebral disc tissue

表 4 大鼠椎间盘组织 TNF-α、IL-1β 平均光密度比较 (n=8)

Table 4 Comparison of the average optical density of TNF-α and IL-1β in rat intervertebral disc tissue

组别 Groups	TNF-α	IL-1β
假手术组 Sham operation group	0.11±0.02	0.09±0.01
模型组 Model group	0.38±0.06 [*]	0.27±0.03 [*]
捏脊组 Chiropractic group	0.22±0.03 ^{*#}	0.19±0.02 ^{*#}
对照组 Control group	0.15±0.03 ^{*##}	0.15±0.02 ^{*##}

注:与假手术组比较, ^{*} *P*<0.05;与模型组比较, [#] *P*<0.05;与捏脊组比较, ^{*} *P*<0.05。

Note. Compared with sham operation group, ^{*} *P*<0.05. Compare with model group, [#] *P*<0.05. Compared with chiropractic group, ^{*} *P*<0.05.

表 5 椎间盘组织中 Caspase-3、Bax 及 Bcl2 mRNA 相对表达量比较 (n=8)

Table 5 Comparison of mRNA relative expression levels of Caspase-3, Bax and Bcl2 in intervertebral disc tissues

组别 Groups	Caspase-3	Bax	Bcl2
假手术组 Sham operation group	1.01±0.01	1.00±0.01	1.01±0.01
模型组 Model group	3.31±0.45 [*]	2.83±0.33 [*]	0.34±0.04 [*]
捏脊组 Chiropractic group	1.55±0.10 ^{*#}	1.51±0.15 ^{*#}	0.63±0.05 ^{*#}
对照组 Control group	1.32±0.09 ^{*##}	1.30±0.13 ^{*##}	0.71±0.05 ^{*##}

注:与假手术组比较, ^{*} *P*<0.05;与模型组比较, [#] *P*<0.05;与捏脊组比较, ^{*} *P*<0.05。

Note. Compared with sham operation group, ^{*} *P*<0.05. Compare with model group, [#] *P*<0.05. Compared with chiropractic group, ^{*} *P*<0.05.

2.5 椎间盘组织中 Caspase-3、Bax 及 Bcl2 mRNA 相对表达量

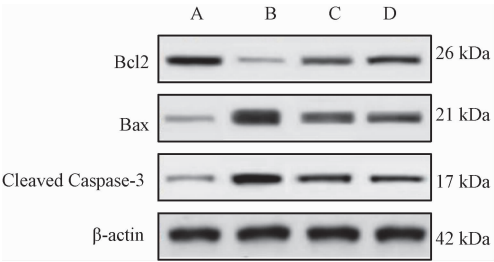
与假手术组比较,其它 3 组大鼠椎间盘组织中 Caspase-3、Bax mRNA 相对表达量升高,Bcl2 mRNA 相对表达量降低($P<0.05$);与模型组比较,捏脊组和对照组大鼠椎间盘组织中 Caspase-3、Bax mRNA 相对表达量降低,Bcl2 mRNA 相对表达量升高($P<0.05$);与捏脊组比较,对照组大鼠椎间盘组织中 Caspase-3、Bax mRNA 相对表达量降低,Bcl2 mRNA 相对表达量升高($P<0.05$)。见表 5。

2.6 椎间盘组织中凋亡相关蛋白表达

与假手术组比较,其它 3 组大鼠椎间盘组织中 Cleaved Caspase-3、Bax 蛋白相对表达量升高,Bcl2 蛋白相对表达量降低($P<0.05$);与模型组比较,捏脊组和对照组大鼠椎间盘组织中 Cleaved Caspase-3、Bax 蛋白相对表达量降低,Bcl2 蛋白相对表达量升高($P<0.05$);与捏脊组比较,对照组大鼠椎间盘组织中 Cleaved Caspase-3、Bax 蛋白相对表达量降低,Bcl2 蛋白相对表达量升高($P<0.05$)。见图 4、表 6。

2.7 椎间盘组织中通路相关蛋白表达量

组间 IKK β 、I κ B α 及 p65 蛋白相对表达水平无显著性差异($P>0.05$);与假手术组比较,其它 3 组大鼠椎间盘组织中 p-IKK β 、p-p65 及 p-I κ B α 蛋白相对表达量升高($P<0.05$);与模型组比较,捏脊组和对照组大鼠椎间盘组织中 p-IKK β 、p-p65 及 p-I κ B α 蛋白相对表达量降低($P<0.05$);与捏脊组比较,对照组大鼠椎间盘组织中 p-IKK β 、p-p65 及 p-I κ B α 蛋白相对表达量降低($P<0.05$)。见图 5、表 7。

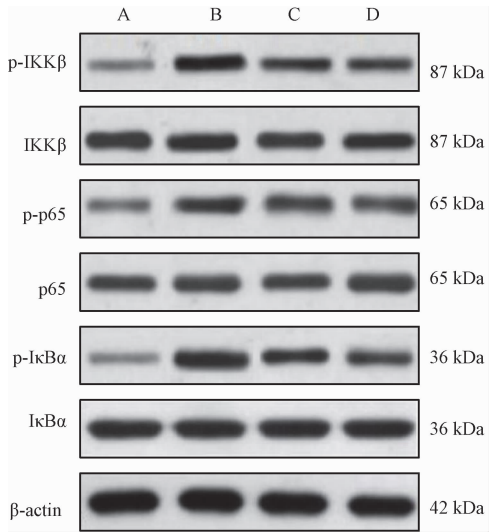


注:A:假手术组;B:模型组;C:捏脊组;D:对照组。

图 4 凋亡相关蛋白 Western blot 条带图

Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, Chiropractic group. D, Control group.

Figure 4 Western blot bands of apoptosis-related proteins



注:A:假手术组;B:模型组;C:捏脊组;D:对照组。

图 5 通路相关蛋白 Western blot 条带图

Note. A, Sham operation group. B, Model group. C, Chiropractic group. D, Control group.

Figure 5 Western blot bands of pathway-related proteins

表 6 椎间盘组织中凋亡相关蛋白相对表达量比较($n=8$)

Table 6 Relative expression levels of apoptosis-related proteins in intervertebral disc tissues			
组别 Groups	Cleaved Caspase-3	Bax	Bcl2
假手术组 Sham operation group	0.15±0.02	0.13±0.02	0.59±0.03
模型组 Model group	0.58±0.04 [*]	0.74±0.05 [*]	0.11±0.01 [*]
捏脊组 Chiropractic group	0.37±0.03 ^{*#}	0.43±0.03 ^{*#}	0.31±0.02 ^{*#}
对照组 Control group	0.28±0.03 ^{*##}	0.39±0.02 ^{*##}	0.39±0.02 ^{*##}

注:与假手术组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与捏脊组比较,^{*} $P<0.05$ 。
Note. Compared with sham operation group, ^{*} $P<0.05$. Compare with model group, [#] $P<0.05$. Compared with chiropractic group, ^{*} $P<0.05$.

表 7 椎间盘组织中通路相关蛋白相对表达量比较($n=8$)

Table 7 Relative expression levels of pathway-related proteins in intervertebral disc tissues						
组别 Groups	IKK β	p-IKK β	I κ B α	p-I κ B α	p65	p-p65
假手术组 Sham operation group	0.72±0.04	0.17±0.02	0.91±0.04	0.11±0.02	0.51±0.03	0.15±0.02
模型组 Model group	0.75±0.05	0.70±0.03 [*]	0.89±0.03	0.62±0.04 [*]	0.52±0.03	0.49±0.05 [*]
捏脊组 Chiropractic group	0.73±0.03	0.31±0.03 ^{*#}	0.91±0.03	0.37±0.03 ^{*#}	0.48±0.05	0.31±0.04 ^{*#}
对照组 Control group	0.72±0.04	0.24±0.02 ^{*##}	0.90±0.03	0.27±0.04 ^{*##}	0.49±0.04	0.22±0.03 ^{*##}

注:与假手术组比较,^{*} $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与捏脊组比较,^{*} $P<0.05$ 。
Note. Compared with sham operation group, ^{*} $P<0.05$. Compare with model group, [#] $P<0.05$. Compared with chiropractic group, ^{*} $P<0.05$.

3 讨论

近年来,IDD 发病率呈上升趋势且趋于年轻化,其所引起的颈、胸、腰椎疾病发病率高达 80%,已成为全球重大健康问题^[8]。椎间盘是一种无血管器官,由 NP、纤维环和软骨终板组成,其中 NP 可稳定椎间盘,缓冲外力对脊柱的冲击^[9],IDD 过程中,NP 组织由于无血管供应,其微环境发生细胞凋亡、细胞衰老、炎症反应及氧化应激等多种病理变化,可导致分解代谢反应增加,合成反应减少,异常生物过程最终会导致椎管狭窄、相邻节段退变和脊柱不稳定等 IDD 相关疾病^[10]。大鼠动静力失衡诱发颈椎间盘退变模型常用于临床研究,不直接影响椎间盘且退变过程相对缓慢,可以很好地模拟人类颈椎退变过程,即颈椎肌肉因现代生活中长期持续的劳损和刺激而减弱。本研究通过手术破坏颈椎肌肉及相关韧带诱导建立动静力失衡成功建立了大鼠颈椎病模型;美洛昔康是一种非甾体抗炎药,常用于治疗类风湿性关节炎、骨关节炎急性加重、强直性脊柱炎和幼年特发性关节炎^[11],可通过减弱氧化应激,抑制炎症级联反应增强神经细胞活力^[12],动物研究中可用于颈椎病治疗^[13],故本实验以其干预效果作为阳性对照。经捏脊治疗后,HE 染色椎间盘组织结果发现,大鼠椎间盘组织的典型退变特征改善,NP 组织形态、细胞结构及与外界纤维环的界限逐渐恢复,提示捏脊治疗可能通过有效改善 IDD 进而治疗颈椎病。

研究表明,纤维环和 NP 在机械损伤、感染、创伤和遗传易感性等刺激下可分泌 TNF- α 和 IL-1 β ,两者均具有强烈的促炎活性,与 IDD 的各种病理过程密切相关,包括炎症反应、基质破坏、细胞衰老、自噬、细胞凋亡、细胞焦亡和增殖,被认为是 IDD 的关键介质^[14]。据报道,TNF- α 水平还与患者的颈部疼痛密切相关,椎间盘突出组织含有血管向内生长,髓核组织中的 TNF- α 可诱发血栓形成并破坏椎间盘突出组织中的血管屏障能进入血液循环,导致外周血中 TNF- α 水平升高^[15];IL-1 β 可刺激多种促炎介质(如细胞因子、趋化因子和基质金属蛋白酶)产生,还可诱导细胞衰老、凋亡促进氧化应激并加速细胞外基质降解^[16],被认为是 IDD 的标志^[17]。Xu 等^[18]研究结果显示,过度机械拉伸应力可诱发的椎间盘中 TNF- α 、IL-1 β 及 IDD,炎症因子表达下调提示中 NP 细胞的炎症和退化减弱。Kang 等^[19]研究发现,TNF- α 和 IL-1 β 的高表达参与颈椎病及腰椎病疼痛,经抑制 IL-1 β 对髓核细胞的分解代谢

作用可防止体内 IDD 发生。本研究结果显示,模型大鼠椎间盘组织中 TNF- α 、IL-1 β 蛋白及血清水平升高,提示颈椎退变伴有局部高水平的 TNF- α 、IL-1 β 介导强烈的炎症反应;而经捏脊治疗后,两者组织中表达及血清中水平均显著下调,提示捏脊在可能是通过降低椎间盘组织及机体促炎因子水平减轻一系列椎间盘细胞损伤,恢复椎间盘内稳态进而抑制 IDD 进展。

累积的 TNF- α 和 IL-1 β 被认为可激活效应 Caspase,通过外在和内在途径发挥促凋亡作用^[20]。细胞凋亡可导致椎间盘组织中活性细胞减少、细胞外基质代谢负平衡及组织稳态的破坏,进而改变正常椎间盘的结构与功能,是加速 IDD 进展的根本原因^[21]。内源性线粒体通路为 IDD 相关的凋亡通路,其中 Bcl-2 家族蛋白通过促凋亡和抗凋亡成员的协同作用控制线粒体外膜通透性来触发线粒体凋亡通路,当线粒体膜电位降低时,膜通透性增加,促凋亡因子释放到细胞质中,细胞色素 c 在 ATP 和 dATP 的帮助下形成凋亡复合物,募集并激活 procaspase-9 以形成 Caspase-9 全酶,Caspase-9 进一步激活效应子 Caspase-3 启动 Caspase 级联反应并最终导致细胞凋亡^[22]。研究发现,下调炎症因子、凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Bax 水平,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达可改善 NP 细胞功能障碍,抑制 IDD 进展^[23-24]。本研究结果显示,与模型组比较,捏脊疗法可显著降低 Caspase-3、Bax 表达及 NP 细胞凋亡率,提示捏脊疗法可能是通过降低促炎因子水平抑制 NP 细胞凋亡途径激活进而减少椎间盘细胞凋亡,促进椎间盘结构及功能恢复进而发挥改善颈椎病作用。

IKK β /NF- κ B 通路是目前研究发现的最经典的炎症通路之一,其中 IKK β 是 IKK 复合物的催化亚基之一,参与经典 NF- κ B 激活的主要激酶,其磷酸化后,I κ B α 被激活,使 NF- κ Bp65 亚基解离进入细胞核并与靶基因结合^[25],NF- κ B 作为一种核转录激活剂,可诱导大量促炎细胞因子转录基因的释放,包括 TNF- α 和 IL-1 β ^[26]。研究发现,IKK β /NF- κ B 参与调节细胞凋亡和炎症反应,该通路被阻断时,TNF- α 、IL-1 β 表达减少,IKK β 、p-I κ B α 及 p-p65 蛋白表达水平降低,细胞凋亡水平及 Caspase-3 活性降低^[4];抑制该通路可改善 IDD 进展^[27]。本研究结果显示,模型组大鼠椎间盘组织中 p-IKK β 、p-I κ B α 及 p-p65 蛋白相对表达水平升高,提示炎症信号通路的激活;而捏脊治疗后可显著逆转此情况,提示捏脊疗法可能是通过介导阻断 IKK β /NF- κ B 通路,

降低炎性因子水平,减少椎间盘细胞凋亡进而抑制 IDD 进展,从而发挥治疗颈椎病的作用。

综上所述,捏脊法可减轻颈椎病大鼠椎间盘细胞炎症性反应及凋亡,改善 IDD 进展,其作用机制可能与抑制 IKK β /NF- κ B 通路有关。

参考文献:

- [1] Yang L, Yang C, Pang X, et al. Mechanoreceptors in diseased cervical intervertebral disc and *Vertigo* [J]. *Spine*, 2017, 42 (8) : 540-546.
- [2] Yang F, Li WX, Liu Z, et al. Balance chiropractic therapy for cervical spondylotic radiculopathy: study protocol for a randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2016, 17(1) : 513.
- [3] Xu H, Wei K, Tu J, et al. Reducing inflammation and vascular invasion in intervertebral disc degeneration *via* cystathionine- γ -lyase inhibitory effect on E-selectin [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 741046.
- [4] Fei M, Li Z, Cao Y, et al. microRNA-182 improves spinal cord injury in mice by modulating apoptosis and the inflammatory response *via* IKK β /NF- κ B [J]. *Lab Invest*, 2021, 101(9) : 1238-1253.
- [5] 纪振伟,姚立东,周杰,等. 颈椎病大鼠模型血清 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的表达及意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38 (11) : 2706-2708.
- [6] 廖军,谢巧瑜,张乐,等. 捏脊疗法对颈椎病模型大鼠纤维环细胞影响的实验研究 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20(5) : 611-614.
- [7] Thompson JP, Pearce RH, Schechter MT, et al. Preliminary evaluation of a scheme for grading the gross morphology of the human intervertebral disc [J]. *Spine (Phila Pa 1976)*, 1990, 15(5) : 411-415.
- [8] Dario AB, Ferreira ML, Refshauge KM, et al. The relationship between obesity, low back pain, and lumbar disc degeneration when genetics and the environment are considered: a systematic review of twin studies [J]. *Spine J*, 2015, 15 (5) : 1106-1117.
- [9] Wang K, Chen T, Ying X, et al. Ligustilide alleviated IL-1 β induced apoptosis and extracellular matrix degradation of nucleus pulposus cells and attenuates intervertebral disc degeneration *in vivo* [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69: 398-407.
- [10] Sun K, Sun X, Sun J, et al. Tissue renin-angiotensin system (tRAS) induce intervertebral disc degeneration by activating oxidative stress and inflammatory reaction [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 3225439.
- [11] Khalil NY, Aldosari KF. Meloxicam [J]. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*, 2020, 45: 159-197.
- [12] Park JH, Park YS, Lee JB, et al. Meloxicam inhibits fipronil-induced apoptosis *via* modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY₅Y cells [J]. *J Appl Toxicol*, 2016, 36(1) : 10-23.
- [13] 姜伟,陈东荣,李琳. 地塞米松通过 Wnt/ β -catenin 信号轴对颈椎病大鼠模型椎间盘纤维环细胞凋亡的影响 [J]. *颈腰痛杂志*, 2022, 43(3) : 331-335.
- [14] Wang Y, Che M, Xin J, et al. The role of IL-1 β and TNF- α in

intervertebral disc degeneration [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110660.

- [15] Li H, Yin J, Huang Y, et al. Establishment of cervical dynamic and static imbalance models and preliminary study on the mechanism of cervical degeneration in rats [J]. *Innate Immun*, 2020, 26(2) : 107-116.
- [16] Yang W, Yu XH, Wang C, et al. Interleukin-1 β in intervertebral disk degeneration [J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 450: 262-272.
- [17] Gorth DJ, Shapiro IM, Risbud MV. A new understanding of the role of IL-1 in age-related intervertebral disc degeneration in a murine model [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(8) : 1531-1542.
- [18] Xu H, Qi G, Li K, et al. Impact of NF- κ B pathway on the intervertebral disc inflammation and degeneration induced by over-mechanical stretching stress [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2021, 18(1) : 6.
- [19] Kang H, Dong Y, Peng R, et al. Inhibition of IRE1 suppresses the catabolic effect of IL-1 β on nucleus pulposus cell and prevents intervertebral disc degeneration *in vivo* [J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 197: 114932.
- [20] Cheng X, Zhang L, Zhang K, et al. Circular RNA VMA21 protects against intervertebral disc degeneration through targeting miR-200c and X linked inhibitor-of-apoptosis protein [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77(5) : 770-779.
- [21] Ma K, Chen S, Li Z, et al. Mechanisms of endogenous repair failure during intervertebral disc degeneration [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019, 27(1) : 41-48.
- [22] Zhang XB, Hu YC, Cheng P, et al. Targeted therapy for intervertebral disc degeneration: inhibiting apoptosis is a promising treatment strategy [J]. *Int J Med Sci*, 2021, 18 (13) : 2799-2813.
- [23] Wang R, Luo D, Li Z, et al. Dimethyl fumarate ameliorates nucleus pulposus cell dysfunction through activating the Nrf2/HO-1 pathway in intervertebral disc degeneration [J]. *Comput Math Methods Med*, 2021, 2021: 6021763.
- [24] Shi J, Wang S, He Q, et al. TNF- α induces up-regulation of microRNA-27a *via* the P38 signalling pathway, which inhibits intervertebral disc degeneration by targeting FSTL1 [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(15) : 7146-7156.
- [25] Olivetto E, Minguzzi M, D' Adamo S, et al. Basal and IL-1 β enhanced chondrocyte chemotactic activity on monocytes are co-dependent on both IKK α and IKK β NF- κ B activating kinases [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1) : 21697.
- [26] Mao SH, Feng DD, Wang X, et al. Magnolol protects against acute gastrointestinal injury in sepsis by down-regulating regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted [J]. *World J Clin Cases*, 2021, 9(34) : 10451-10463.
- [27] Chen ZB, Yu YB, Wa QB, et al. The role of quinazoline in ameliorating intervertebral disc degeneration by inhibiting oxidative stress and anti-inflammation *via* NF- κ B/MAPKs signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24 (4) : 2077-2086.